Aus dem Institut für Virologie und Immunbiologie
der Universität Würzburg
Vorstand: Prof. Dr. E. Wecker

Über die Wirkung des 12,13-Epoxytrichothecens Betainyldiacetoxyscirpenoliumchlorid auf die Nucleinsäuresynthese in unstimulierten und mitogenstimulierten peripheren menschlichen Lymphozyten

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfaßt und der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Tillmann Neudecker

aus Würzburg

Würzburg, den 24. 1. 1980

Aus dem Institut für Virologie und Immunbiologie
der Universität Würzburg
Vorstand: Prof. Dr. E. Wecker

Über die Wirkung des 12,13-Epoxytrichothecens Betainyldiacetoxyscirpenoliumchlorid auf die Nucleinsäuresynthese in unstimulierten und mitogenstimulierten peripheren menschlichen Lymphozyten

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfaßt und der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Tillmann Neudecker

aus Würzburg

Würzburg, den 24. 1. 1980

Referent: Prof. Dr. E. Wecker
Korreferent: Prof. Dr. E. Helmreich
Dekan: Prof. Dr. K.-H. Wulf

Tag der mündlichen Prüfung: 14. 5. 1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Würzburg

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
EINLEITUNG	1
MATERIAL UND METHODEN	4
ERGEBNISSE UND DISKUSSION	10
I. Optimierung des Zellkultursystems	10
1. DNA-Synthese in mitogenstimulierten Blutzellen	10
a) Einfluß der Mitogenkonzentration	10
b) Kinetik der DNA-Synthese	15
c) Einfluß des Plasmas	15
d) Wirkung des Plasmas auf die DNA-Synthesephase	22
2. RNA-Synthese in mitogenstimulierten Blutzellen	25
a) Einfluß der Mitogenkonzentration	25
b) Kinetik der RNA-Synthese	27
3. Bestimmung der Wirkdauer von PHA-M	27
4. Zusammenfassung	32
II. Wirkung von Betainylanguidinchlorid (BAC) auf die DNA-Synthese	33
1. Konzentrationsabhängigkeit	33
2. Wirkung von BAC in den verschiedenen Phasen der Stimulation von Blutzellen	36
3. Kinetik der DNA-Synthesehemmung	37
III. Wirkung von BAC auf die RNA-Synthese	42
1. Konzentrationsabhängigkeit	42
2. Kinetik der RNA-Synthesehemmung	45
IV. Wirkung von BAC auf die RNA-Synthese in unstimulierten Blutzellen	51
V. Reversibilität der Wirkung von BAC auf die DNA-Synthese	51

Seite

VI. Zur Frage der Zellspezifität der BAC-Wirkung 62

VII. Überlegungen zum Wirkungsmechanismus von BAC 65

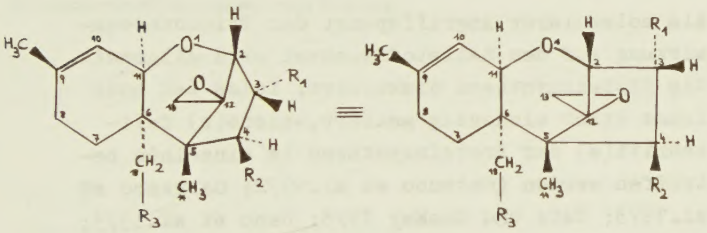
ZUSAMMENFASSUNG 71

LITERATURVERZEICHNIS 72

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS 76

E I N L E I T U N G

Betainyldiacetoxyscirpenoliumchlorid (Betainyl-anguidinchlorid) ist ein Derivat des in den Pflanzen parasitären Pilzen Fusarium equiseti und Fusarium scirpi vorkommenden sesquiterpenoiden 12,13-Epoxy-trichothecens Diacetoxyscirpenol, das 1965 in seiner Struktur aufgeklärt wurde (Sigg et al.1965; Dawkins et al.1965) und sich, ebenso wie das Verseifungs-produkt Scirpentriol, als Cytostaticum und Cyto-toxicum von bemerkenswerter Wirksamkeit erwies (Grove und Mortimer 1969).



Diacetoxyscirpenol: R_1= OH; R_2=R_3= OAc

Scirpentriol: R_1=R_2=R_3= OH

Betainyldiacetoxyscirpenoliumchlorid: R_1=$-O-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-CH_2-\overset{+}{N}(CH_3)_3\ Cl^-$

R_2=R_3= OAc

Diese für die Stoffklasse der 12,13-Epoxytrichothecene typische starke Toxizität ist sowohl medizinisch als auch ökonomisch von Bedeutung. Sie spielt eine entscheidende Rolle bei bestimmten Mycotoxicosen, die sowohl beim Menschen als auch bei Haustieren beobachtet werden und ihre Ursache im Konsum von durch Pilzbefall verdorbenen Früchten und Getreide haben (Bamburg 1972; Wei et al.1974).

Die ungewöhnliche Toxizität steht bisher einer klinischen Anwendung von 12,13-Epoxytrichothecenen als Antitumorwirkstoffe im Sinne ihrer ausgeprägten cytostatischen Wirkung im Wege (Bamburg und Strong 1971; Bamburg 1972). Hauptziel der toxischen Wirkung scheint dabei die Blutzellenbildung zu sein (Rüsch und Stähelin 1965). So zerstört Diacetoxyscirpenol Knochenmarkzellen schon in sehr geringer Dosierung. Bei höheren,fast letalen Dosen wurde eine immunsuppressive Wirkung über eine Erniedrigung des Antikörpertiters im Blut beobachtet (Stähelin et al.1968).

Als molekularer Angriffspunkt der Trichothecenwirkung auf den Zellstoffwechsel wird allgemein die Proteinsynthese diskutiert. Indes ist noch immer nicht eindeutig geklärt,welche(r) Teilschritt(e) der Proteinsynthese im einzelnen betroffen werden (Ohtsubo et al.1972; Carrasco et al.1973; Tate und Caskey 1973; Ueno et al.1973; Stafford und McLaughlin 1973; Cundliffe et al. 1974; Wei et al.1974). Diacetoxyscirpenol soll nach Untersuchungen in vitro sowohl die Initiation als auch die Elongation sowie die Termination hemmen (Wei und McLaughlin 1974).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es,die Wirkung des im Gegensatz zu Diacetoxyscirpenol gut was-

serlöslichen Betainyldiacetoxyscirpenoliumchlorid (Betainylanguidinchlorid, nachfolgend kurz BAC genannt) auf die Nucleinsäuresynthese in mitogenstimulierten und unstimulierten menschlichen Blutzellen (peripheren Lymphozyten) zu untersuchen. Geklärt werden sollte zunächst die Frage, ob überhaupt und in welchem Ausmaß die Nucleinsäuresynthese in menschlichen Lymphozyten auf die Einwirkung von BAC reagiert. Sodann galt es zu untersuchen, ob BAC unterschiedliche Wirkung zeigt, je nachdem, ob es sich um mitogenstimulierte oder nicht stimulierte Lymphozyten handelt. Weiter wurde die Frage untersucht, ob sich die Empfindlichkeit der DNA- und RNA-Synthese gegenüber BAC in Korrelation zu den einzelnen Phasen der Mitogenstimulierung beziehungsweise Nucleinsäuresynthese ändert. Schließlich wurde besonderer Wert auf die Klärung der Frage gelegt, ob die Toxinwirkung auf den Nucleinsäurestoffwechsel generell reversibel ist und ob Unterschiede in der Reversibilität während verschiedener Stimulierungsphasen auftreten.

MATERIAL UND METHODEN

MATERIAL:

Blut:

Venöses Blut des Autors wurde jeweils unmittelbar vor Versuchsansatz entnommen, durch Zugabe von 20 Einheiten Heparin/ml ungerinnbar gemacht, und sofort in die Inkubationsröhrchen gegeben. Eine Zellzählung ergab folgende Werte: 5,4 x 10^6 Erythrozyten/µl und 8,8 x 10^3 Leukozyten/µl.
Für spezielle Versuche wurden vor Versuchsbeginn die Erythrozyten analog dem einfachen Verfahren von Reichert(1973) abgetrennt. Hierzu wurde das frisch entnommene, heparinisierte Blut in 3 ml-Portionen auf sterile Glasröhrchen (10 x 80 mm) verteilt, für 90 Minuten bei 37° ruhig stehen gelassen, und nach Absitzen der Erythrozyten der Leukozytenreiche Überstand mit einer sterilen Pasteurpipette vorsichtig abgezogen.

Kulturmedien:

a) RPMI 1640 wurde freundlicherweise vom Institut für Virologie, Universität Würzburg, zur Verfügung gestellt.
b) In einem Fall (vgl. Fig.4) wurde diesem Medium noch Glutamin in einer Endkonzentration von 2 mM zugesetzt.
c) Eagle's Minimal Essential Medium (MEM) ohne Natriumhydrogencarbonat (Microbiological Associates Inc. Nr. 12125, bezogen über Cooke Instruments A.G., Zollikon, Schweiz) wurde pro 100 ml folgende Lösungen zugesetzt: 1 ml nichtessentielle Aminosäuren - 100fach konzentriert (Nr.13-113)
1 ml Glutamin, 200 mM (Nr.17-665)
1 ml Na-Pyruvat, 100 mM (Nr.13-115).

Allen Medien wurde vor Verwendung jeweils 0,1 ml einer Antibioticalösung pro 100 ml zugesetzt. Diese setzte sich aus 3 g Penicillin (Höchst) und 5 g Streptomycin (Höchst), gelöst in 50 ml Wasser, zusammen.
Vor Zugabe zu den Kulturansätzen wurden die Medien immer sorgfältig auf 37° erwärmt und vorbegast.

Gasgemisch:

10 % CO_2, 7 % O_2, 83 % N_2 (Tyczka A.G., Industriegas, Würzburg).

[^{3}H] Thymidinlösung:

0,1 ml, in einzelnen Fällen auch 0,2 ml (vgl. Legenden) [^{3}H] Thymidinlösung (spez.Akt. 6,3 mCi/mMol, New England Nuclear, 7,5 x 10^{-4} M) wurden mit 0,2 ml nichtmarkierten

Thymidins (Boehringer,Mannheim), 7,5 x 10^{-4} M,in 10 ml RPMI 1640 zu einer spezifischen Aktivität von 2,0 bzw. 4,0 µCi/µMol verdünnt.

^{14}C Uridinlösung:

Von New England Nuclear in einer spezifischen Aktivität von 400 uCi/µMol bezogen und ohne Veränderung in einer Dosierung von 0,2 µCi (125 nMol)/ml eingesetzt.

KCl-Lösung (0,2 M),physiologische NaCl-Lösung (0,85%ig) und Trichloressigsäurelösung (5%ig):

Merck,Darmstadt.

Zählflüssigkeit:

8 g Butyl-PBD, 35 g CAB-O-SIL, 150 g Naphthalin (alles Fa. Zinsser,Frankfurt) in 1 Liter Dioxan gelöst.

Heparin-Litiumsalz A Grade: Calbiochem.

Phytohämagglutinin (PHA-M):

Difco Laboratories,Detroit, Nr.3110-55.

Concanavalin (Con A):

Pharmacia Fine Chemicals, Nr.3059,Frankfurt.

1-Betainyl-2,3diacetoxyscirpenolium-chlorid (Betainyl-anguidinchlorid = BAC) und 114-HFS-1 (Ovalicin) wurde von Dr. H. P. Sigg,Basel,zur Verfügung gestellt.

Mitogene und Hemmstoffe wurden bei 4° aufbewahrt,vor Versuchsbeginn immer frisch abgewogen und in Medium gelöst. Alle Medien und radioaktiven Lösungen waren membransterilisiert und wurden bei 4° bzw. -20° gelagert.

GERÄTE:

a) für den Kulturansatz:

Kulturröhrchen:

15 x 75 mm,aus Polypropylen,mit Steckverschluß, Greiner und Co.,Nürtingen,Nr.2172.

Plastikreagenzröhrchen:

30 x 115 mm, 50 ml, Falcon Plastics,Los Angeles,Nr.2070.

Pasteurpipetten:

150 mm

Microliterpipetten:

Modell Eppendorf

Kulturkammern:

Plexiglas, 7,5 Liter, gasdicht, wurden von der Feinmechanischen Werkstatt der Chemischen Institute der Universität Würzburg angefertigt.

b) für die Gewinnung des säureunlöslichen Materials:

Glasfilterfritte:

20 mm Durchmesser, hergestellt in der Feinmechanischen Werkstatt der Chemischen Institute der Universität Würzburg.

Membranfilter:

20 mm Durchmesser, 1,2 µm Porengröße, Sartorius GmbH., Göttingen.

Scintillationszähler:

Tricarb, Packard, Modell 3320.

c) für die Reinigung und Sterilisierung der Geräte:

Membranfiltrationsgerät:

250 ml, Sartorius GmbH., Göttingen, Nr. SM 16 510.

Filter:

0,45 um Porengröße, 50 mm Durchmesser, Sartorius GmbH., Göttingen, Nr. SM 13 400.

Glasgeräte wie Pipetten und Pasteurpipetten - jeweils mit Wattestopfen versehen - wurden 3 Stunden bei 150° trocken sterilisiert, das Membranfiltrationsgerät 30 Minuten lang mit den eingelegten Filtern bei 120 atü autoklaviert. Kulturröhrchen wurden vor Wiederverwendung gründlich ausgespült, über Nacht in 6 N HCl eingeweicht, mit destilliertem Wasser sorgfältig nachgewaschen und dann autoklaviert. Plastikreagenzröhrchen wurden nach gründlicher Reinigung durch 30-minutige UV-Bestrahlung sterilisiert.

METHODEN:

a) Testansatz:

Prinzipiell wurde bei den hier geschilderten Versuchen folgender Standardtest nach Park und Good (1972) verwendet:

> Pro Kulturröhrchen wurden zunächst 50 µl Medium mit variablen Konzentrationen an PHA-M bzw. Con A einpipettiert und zur Einstellung des pH-Wertes - bis zum Wechsel der Mediumfarbe von blaurot nach gelborange - in der begasten Inkubationskammer bei 37° etwa eine halbe Stunde lang vorinkubiert. Dann wurden je 50 µl frisch entnommenes, heparinisiertes Blut zugesetzt. Nach 24 Stunden Inkubation (Bedingungen immer: 37°, 10% CO_2, 7% O_2 und 83% N_2) wurden jeweils 50 µl [^{3}H] Thymidin- bzw. [^{14}C] Uridinlösung (spezifische Aktivitäten siehe Legenden) zupipettiert und noch weitere 24 Stunden bzw., bei Messung einer Kinetik verschieden lange, weiterinkubiert.
>
> Schon bei der Blutentnahme, beim Zusatz der membransterilisierten Heparinlösung und insbesondere bei jedem Pipettieren wurde sehr auf größtmögliche Sterilität geachtet.
>
> Nach jedem Öffnen der Inkubationskammer (beispielsweise Probenentnahmen während einer Kinetik oder [^{3}H] Thymidinzusatz nach 24 Stunden) wurde die Inkubationskammer wieder kurz begast.

Dieser Standardansatz wurde für bestimmte Fragestellungen in verschiedener Weise variiert (vgl. Legenden). Insbesondere das Inkubationsvolumen wurde bei einigen Versuchen schon von Beginn an oder auch erst im Laufe der Inkubation von 0,1 ml (vor Pulszusatz) auf 1 ml (950 µl Medium plus 50 µl Blut) erhöht. Die sich daraus ergebenden Konsequenzen werden jeweils im Text ausführlich diskutiert. Unverändert blieb in jedem Fall die eingesetzte Blutmenge (Zelldichte) und das Volumen der radioaktiven Nucleotidlösungen (je 50 µl).

b) Gewinnung des säureunlöslichen Materials:

Am Ende der Inkubation wurden die Teströhrchen aus der Inkubationskammer genommen und bis zur eigentlichen Aufarbeitung in Eis gestellt.

Bei der Aufarbeitung selbst wurden jedem Röhrchen zunächst 3 ml H_2O zugesetzt und der Zellbodensatz durch schnelles mehrfaches Ansaugen und Auspressen des Röhr-

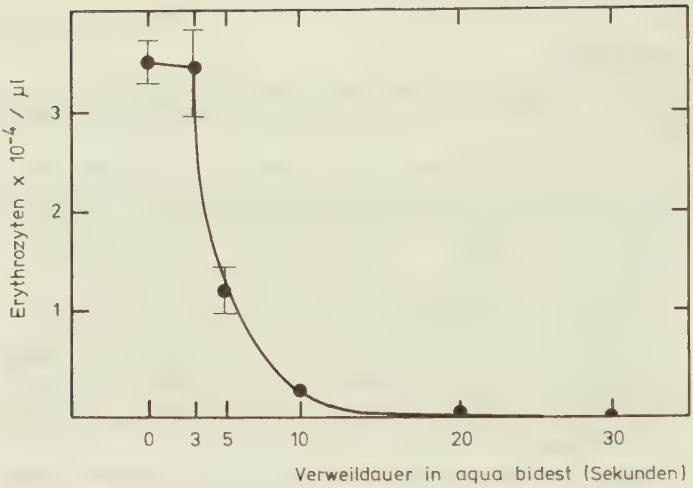


Fig.1: Hämolysekinetik der Erythrozyten.
Zu je 50 µl Blut wurden zum Zeitpunkt 0 je 5 ml H_2O bidest. gegeben und zu den Zeitpunkten 0,3,5,10,20 und 30 Sekunden die Hämolyse durch Zusatz von je 1 ml 3,4%iger NaCl-Lösung (Endkonzentration NaCl = 0,85%) gestoppt. Dann wurden die noch intakten Erythrozyten in den einzelnen Proben in der Thomakammer gezählt.

cheninhalts mit Hilfe einer Pasteurpipette aufgewirbelt und suspendiert. Nach etwa 15 Sekunden,d.h. nach praktisch vollständiger Lyse der Erythrozyten (Fig.1)*, wurde der Inhalt der Kulturröhrchen auf Milliporefilter (vgl. Material) geschüttet und abgesaugt. Nachgewaschen wurde mit je 4 ml kalter, 0,85 %iger NaCl-Lösung und daraufhin noch mit je 4 ml kalter, 5 %iger Trichloressigsäurelösung.

Nach kräftigem Absaugen der Waschlösungen wurden die Filterplättchen in Zählgläschen gelegt und je 0,5 ml

* Um sicherzustellen,daß während dieser 15 Sekunden nicht nur die bequem meßbare Lyse der Erythrozyten vollständig ablaufen kann,sondern vor allem auch die eigentlich interessierenden Lymphozyten maximal lysiert werden,wurde in einem Kontrollexperiment die Lysezeit,d.h. der Zeitraum zwischen H_2O-Zusatz und Absaugen,variiert. Dabei zeigte sich,daß Lysezeiten länger als 15 Sekunden keine signifikante Steigerung der Zählausbeute bewirken.

0,2 N KOH zupipettiert. Nach 30 Minuten Einwirken der KOH auf die Filterplättchen wurde Zählflüssigkeit (je 15 ml) zugegeben und 2 Stunden später im Tricarb gezählt. Diese Aufarbeitungsprozedur wurde bei sämtlichen Proben angewendet,unabhängig vom Inkubationsvolumen und sowohl bei Messung der DNA- als auch der RNA-Synthese. Kontrollversuche hatten ergeben,daß die Zählausbeute bei dieser Technik vom jeweiligen Volumen des aufzuarbeitenden Ansatzes nicht merklich beeinflußt wird.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

I. OPTIMIERUNG DES ZELLKULTURSYSTEMS

1. DNA-Synthese in Mitogen-stimulierten Blutzellen

a) Einfluß der Mitogenkonzentration

Unter dem Einfluß von PHA-M werden periphere Lymphozyten im Blut zum Einbau von ^{3}H-Thymidin in säureunlösliches Zell-Lysat, d.h. zur DNA-Synthese, veranlaßt. Das Ausmaß der Synthese ist abhängig von der Mitogenkonzentration (Newsome 1965). Sehr hohe Konzentrationen an PHA-M wirken inhibitorisch (Wilson 1966).

In den für diese Arbeit verwendeten Versuchsansätzen ist eine optimale Stimulation des Thymidineinbaus bei einer PHA-M-Konzentration von 200 µg/ml zu beobachten (Fig.2).

Verglichen mit den Befunden anderer Autoren - die allerdings unter anderen Testbedingungen arbeiteten - erscheint diese Optimalkonzentration sehr hoch (Ling 1968). Sie stimmt aber gut mit den Ergebnissen überein, die Park und Good (1972) bei ihren Untersuchungen erhielten.

Die Ursache für diesen hohen Mitogenbedarf liegt nicht in der Art des verwendeten Lectins. Wird PHA-M, dessen aktives Prinzip bekanntlich aus mehreren ähnliche Proteinen mit je nach Herkunft wechselnder Zusammensetzung und noch ungeklärter Struktur besteht (Ling 1968), durch das chemisch definierte und gut charakterisierte Mitogen Concanavalin A (Con A) ersetzt (Sumner et al. 1956; Edelman et al. 1972), so ergeben sich daraus keine signifikanten Änderungen in der

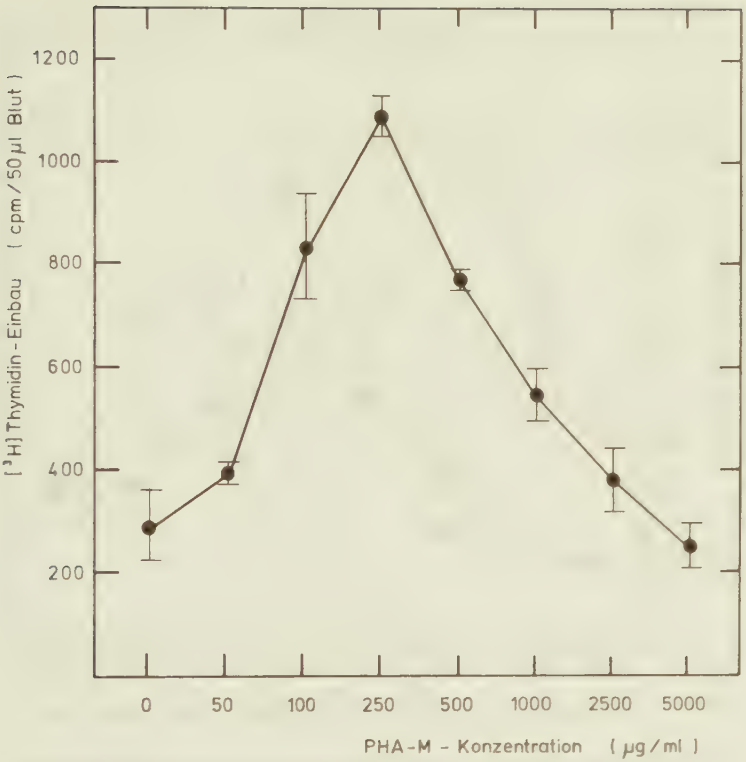


Fig.2: Konzentrationsabhängigkeit der PHA-M-Stimulierung von Blutzellen.
Zu je 50 µl heparinisierten Blutes wurden je 50 µl RPMI 1640 mit verschiedenen Konzentrationen an PHA-M - Endkonzentrationen siehe Abszisse - gegeben. Nach 24 Stunden Inkubation bei 37° und 10% CO_2, 7% O_2, 83% N_2 wurden jeweils 50 µl RPMI 1640 mit je 0,5 µCi [³H]Thymidin (spez. Akt. 2.0 µCi/µMol) zugesetzt und unter den gleichen Bedingungen noch weitere 24 Stunden inkubiert. Danach Aufarbeitung und Auswertung wie unter Material und Methoden beschrieben.

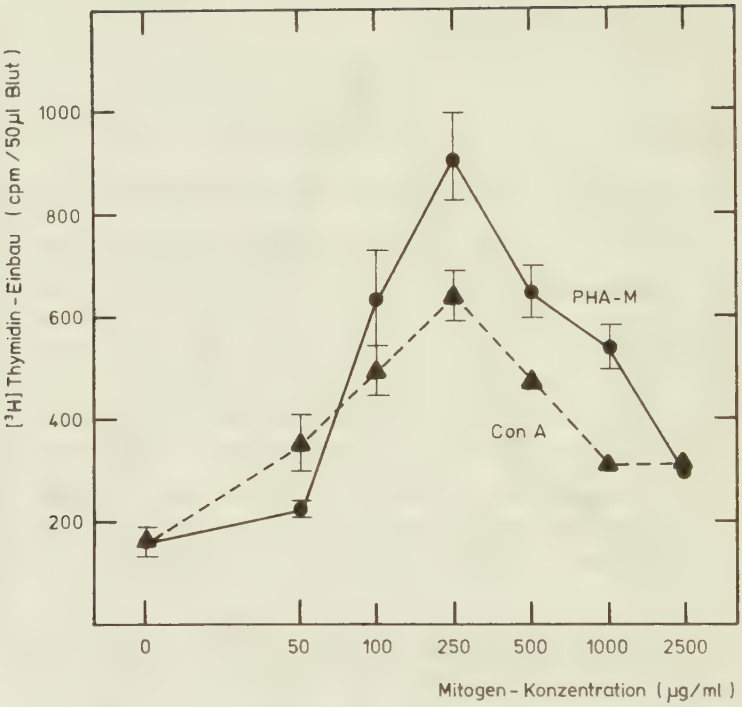


Fig.3: Vergleich der Stimulationswirkung von PHA-M und Con A auf Blutzellen.
Bedingungen und Durchführung wie in Legende Fig.2 beschrieben;neben PHA-M wurde in diesem Fall auch Con A als Mitogen eingesetzt.

Konzentrationsabhängigkeit der Mitogenwirkung. Überdies kann Con A selbst in optimaler Konzentration die Blutzellen nicht besser stimulieren als PHA-M (Fig.3). Ebenso sind Variationen des Kulturmediums ohne nennenswerten Einfluß (Fig.4).

Die Gegenwart von Erythrozyten hat keinen Einfluß auf

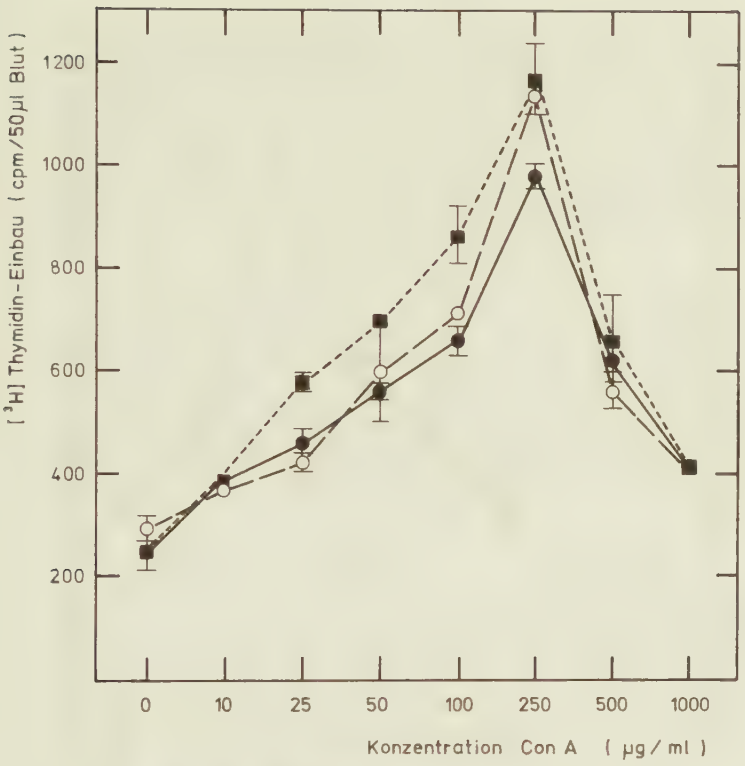


Fig.4: Vergleich der Stimulationswirkung von Con A auf Blutzellen bei Variation des Kulturmediums. Stimulation mit Con A, sonstige Bedingungen wie in Legende Fig.2 beschrieben. Verwendete Medien: MEM (■), RPMI 1640(-Glutamin) (O), RPMI 1640(+Glutamin). Zusammensetzung dieser Medien vgl. Material und Methoden.

die Stimulation. Auch nach weitgehender Abtrennung der roten Blutzellen - vgl. Material und Methoden - entspricht die Stimulierbarkeit des Lymphozyten-reichen Restbluts recht genau den an unfraktioniertem Blut gewonnenen Befunden (Fig.5).

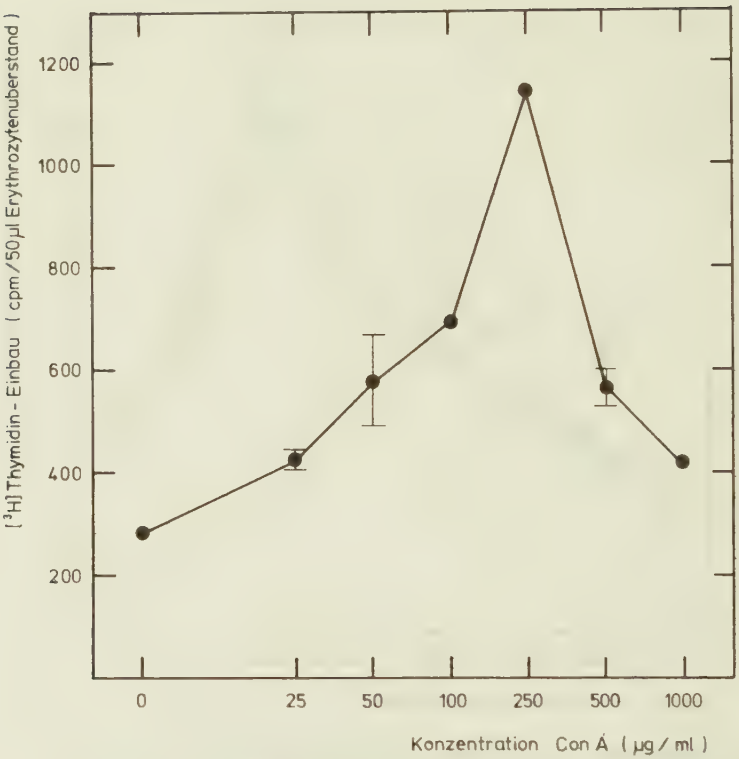


Fig.5: Konzentrationsabhängigkeit der PhA-M-Stimulierung von Blutzellen nach Abtrennung der Erythrozyten. Heparinisiertes Blut wurde 90 Minuten bei 37° stehen gelassen, der Leukozyten-haltige Erythrozytenüberstand dann vorsichtig entnommen (vgl. Material und Methoden) und 1:1 mit RPMI 1640 verdünnt. Von dieser Lösung wurden je 100 µl pro Tube eingesetzt und jeweils noch 100 µl RPMI 1640 mit verschiedenen Konzentrationen an PhA-M (Endkonzentrationen siehe Abszisse) hinzugegeben. Inkubationsbedingungen, Puls und Aufarbeitung wie in Legende Fig.2 beschrieben.

Somit kommen Erythrozyten als Ursache für den hohen Mitogenbedarf zur optimalen Stimulierung - etwa infolge unspezifischer Absorbtion des Mitogens - und für die vergleichsweise geringen Einbauraten von [^{3}H] Thymidin in säureunlösliches Zell-Lysat selbst im optimalen Mitogenkonzentrationsbereich nicht in Betracht.

b) Kinetik der DNA-Synthese

Wie auch in allen anderen Fällen setzt die DNA-Synthese in stimulierten Blutzellen nicht unmittelbar bei der Zugabe des Lectins ein. Sie beginnt vielmehr nach 24 Stunden und erreicht zwischen der 30. und 48. Stunde nach Zusatz des Mitogens ihr Optimum. Später nimmt die DNA-Syntheserate wieder ab (Fig.6).

c) Einfluß des Plasmas

Auf der Suche nach den Ursachen sowohl für den hohen Mitogenbedarf zur optimalen Stimulierung der Blutzellen als auch für die relativ geringen Einbauwerte von [^{3}H] Thymidin (vgl. Park und Good 1972) zeigt es sich, daß das Volumen des Inkubationsansatzes von entscheidendem Einfluß auf das Stimulationsgeschehen ist.

Wird das Volumen des Park-Goodschen Originalansatzes - 50 µl Medium und 50 µl Blut - durch Zusatz von Medium von 0,1 ml auf 1 ml erhöht, so kommt es zu auffälligen Veränderungen der Mitogenwirkung (Fig.7).

Bemerkenswert ist vor allem, daß die Stimulationsrate in den Ansätzen mit 1 ml Volumen (vgl. Fig.7a u. b (●)) unabhängig vom Zeitpunkt der Volumenvergrößerung beträchtlich höher liegt als in den Ansätzen mit nur 0,1 ml Volumen (vgl. Fig.7a u. b (○)). Weiter fällt auf, daß die Mitogenkonzentrationsabhängigkeit der Stimulation im 1 ml Testvolumen entscheidend davon beeinflußt wird, zu welchem Zeitpunkt die Volumenerhöhung von 0,1 ml

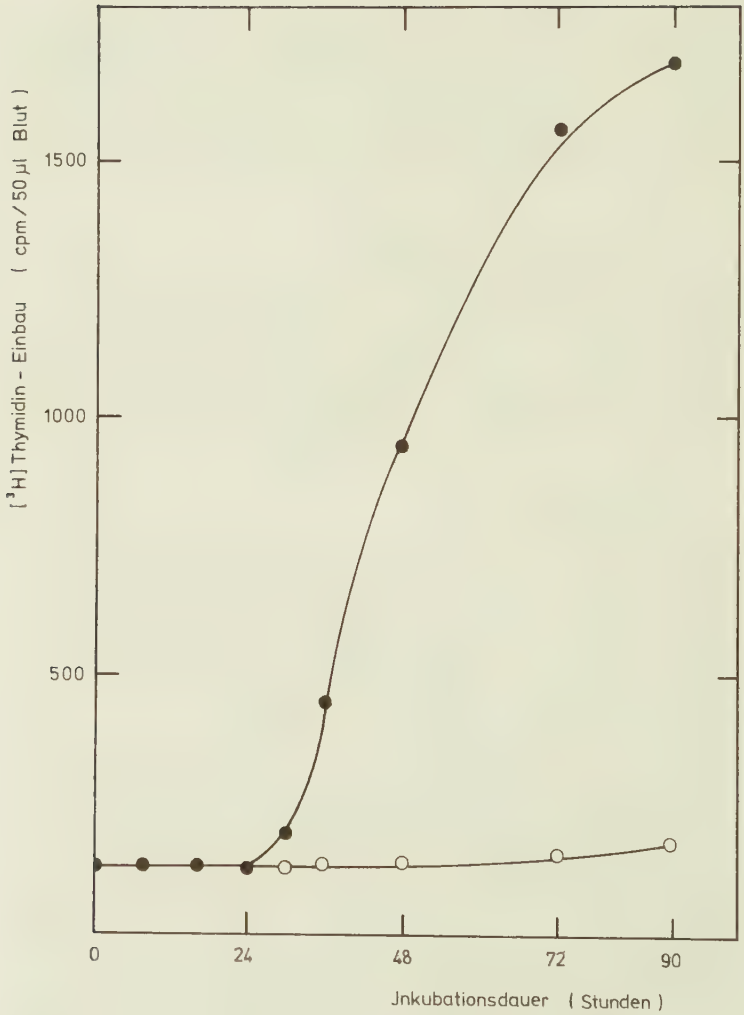


Fig.6: Kinetik der DNA-Synthese in PHA-M-stimulierten Blutzellen.
Zu 50 µl Blut wurden je 50 µl RPMI 1640 mit 0,5 µCi [³H]-Thymidin (spez.Akt. 2,0 µCi/µMol) und 1 ml RPMI 1640 mit 250 µg PHA-M/ml gegeben. Inkubationsbedingungen siehe Legende Fig.2, Probenentnahmen zu verschiedenen Zeiten (vgl. Abszisse).

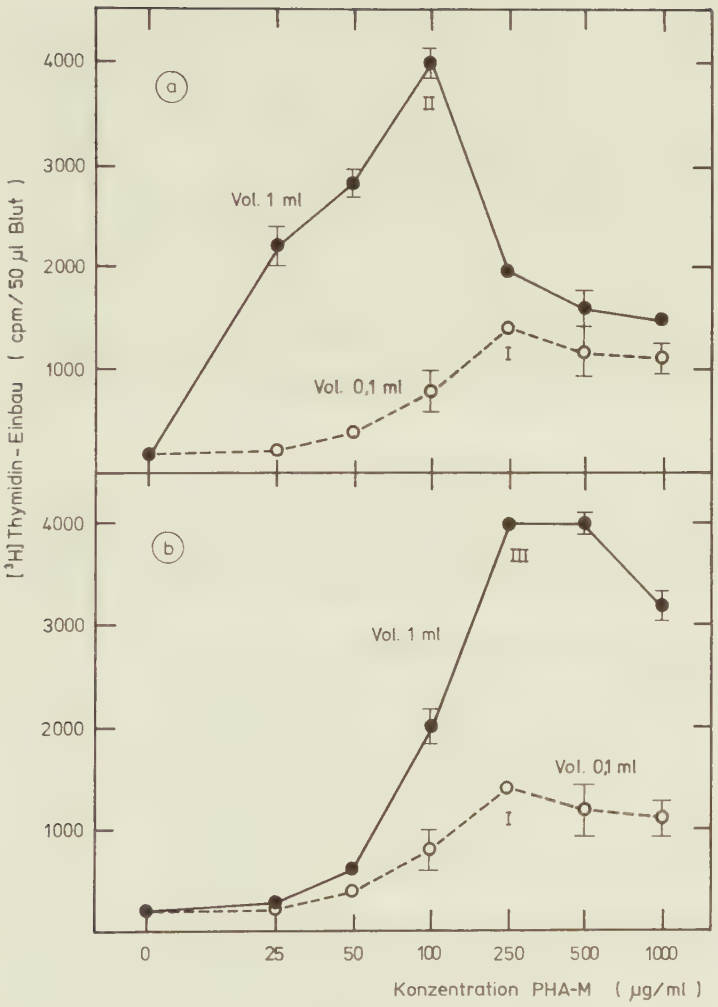


Fig.7 (Legende siehe nächste Seite)

Fig.7: Einfluß einer Volumenvergrößerung des Inkubationsansatzes auf die Stimulation der Blutzellen.
a) Zu je 50 µl Blut wurden je 50 µl (○) bzw. 950 µl (●) RPMI 1640 mit verschiedenen PHA-M-Konzentrationen (Endkonzentrationen vgl. Abszisse) gegeben. Nach 24 Stunden Inkubation (37°, 10% CO_2, 7% O_2, 83% N_2) wurden je 50 µl RPMI 1640 mit 0,5 µCi [^{3}H] Thymidin (spez. Akt. 2,0 µCi/µMol) zugesetzt, weitere 24 Stunden inkubiert, dann aufgearbeitet.
b) Zu je 50 µl Blut wurden in jedem Fall zunächst nur 50 µl RPMI 1640 mit verschiedenen Konzentrationen an PHA-M gegeben und nach 24 Stunden Inkubation [^{3}H] Thymidin wie bei a) zugesetzt. Im Gegensatz zu a) erfolgte die Volumenvergrößerung durch Zusatz von 950 µl RPMI 1640 (●) nicht schon zum Zeitpunkt 0, sondern erst nach 24 Stunden, zusammen mit der Zugabe von [^{3}H] Thymidin. Die aufgetragenen PHA-M-Konzentrationen (Abszisse) beziehen sich auf die ersten 24 Stunden der Inkubation, bis zum Zusatz von [^{3}H] Thymidin (○) bzw. [^{3}H] Thymidin plus 950 µl RPMI 1640 (●).

auf 1 ml stattfindet. Beträgt das Inkubationsvolumen bereits zu Beginn 1 ml, so verschiebt sich die optimale Mitogenkonzentration von 250 µg PHA-M/ml im 0,1 ml Ansatz nach 100 µg/ml im 1 ml Ansatz (vgl. Fig.7a, Punkte I u. II).

Findet hingegen die Verdünnung erst nach 24 Stunden, also unmittelbar vor Beginn der DNA-Synthese statt (vgl. Fig. 7b), so ist jetzt die intensivste DNA-Synthese in eben jenen Ansätzen zu beobachten, deren Mitogenkonzentration vor der Verdünnung 250 µg/ml war (vgl. Fig.7b, Punkte I u. III). Anders als bei einer Verdünnung zum Zeitpunkt 0 (vgl. Fig.7a) hat die Verdünnung der für 0,1 ml Ansätze optimalen PHA-M-Konzentration von 250 µg/ml auf 25 µg/ml (Vol. 1 ml) zum Zeitpunkt 24 Stunden offenbar keinen Einfluß mehr auf die Stimulation selbst. Vielmehr hat die Volumenerhöhung zu diesem Zeitpunkt nur noch eine allgemeine Steigerung der nachfolgenden DNA-Synthese zur Folge (vgl. Fig.7b, Kurven (○) u. (●)).

Schon dieser Befund deutet darauf hin, daß die Stimulation der Blutzellen innerhalb der ersten 24 Stunden

Inkubation stattfindet und die Mitogenkonzentration nur innerhalb dieses Zeitraums relevant ist. Die Beobachtung, daß die Konzentrationsabhängigkeit der Mitogenstimulation von Blutzellen deutliche Unterschiede zeigt, je nachdem, ob die Erhöhung des Inkubationsvolumens schon zu Beginn oder erst nach 24 Stunden stattfindet, wird später nocheinmal diskutiert werden. Sie erlaubt nämlich festzustellen, wie lange das Mitogen auf die Blutzellen einwirken muß, um diese optimal stimulieren zu können.

An dieser Stelle ist zunächst zu fragen, warum eine Erhöhung des Inkubationsvolumens durch Mediumzusatz überhaupt eine so deutliche Steigerung des [^{3}H]Thymidineinbaus verursacht.

Naheliegend sind folgende Hypothesen, wobei zu beachten ist, daß zunächst zwischen Einflüssen auf den eigentlichen Stimulierungsvorgang und Wirkungen lediglich auf die Indikatorreaktion ([^{3}H]Thymidineinbau in säureunlösliches Zell-Lysat) nicht unterschieden werden kann:

a) Durch erhöhten Mediumzusatz werden mögliche schädliche Begleitstoffe im verwendeten PHA-M-Präparat ausverdünnt und dadurch weniger wirksam.

b) In den 0,1 ml Ansätzen kommt es im Verlauf der Inkubation zur Erschöpfung eines oder mehrerer Nährstoffe. Durch Zusatz von mehr Medium wird dieser Aushungerungseffekt vermieden.

c) Mit der Volumenerhöhung durch Mediumzusatz zum Inkubationsansatz ist eine entsprechende Plasmaverdünnung gekoppelt. Dadurch wird auch die Konzentration einzelner oder mehrerer, möglicherweise schädlicher Plasmafaktoren reduziert, die die Stimulation der Blutzellen beeinträchtigen können.

Im Hinblick auf die eigentliche Zielsetzung dieser Arbeit ist eine erschöpfende Klärung dieser Fragen nicht angestrebt worden. Gegen Hypothese a sprechen freilich schon eindeutig die Befunde aus Fig.7a,wo ein Steigerungseffekt durch Volumenerhöhung auch dann beobachtet wurde,wenn die Mitogenkonzentration dabei unverändert blieb. Es läßt sich aber zeigen,daß die Plasmakonzentration das Stimulationsgeschehen ganz entscheidend beeinflußt.

Im Park-Goodschen Ansatz von 0,1 ml Volumen - 50 µl Blut und 50 µl Medium - liegt die Konzentration des Plasmas bei etwa 25 Prozent (Blut selbst enthält ca. 50 Prozent Plasma). Ist schon zu Beginn der Stimulation das Inkubationsvolumen von 0,1 ml auf 1 ml erhöht und gleichzeitig der Plasmagehalt des zusätzlichen Kulturmediums zwischen 0 und 50 Prozent variiert,so zeigt sich,daß die zur optimalen Stimulierung nötige Mitogenkonzentration von der jeweils vorliegenden Plasmakonzentration bestimmt wird. Je höher die Plasmakonzentration im Inkubationsansatz,desto mehr Mitogen ist nötig,um die Blutzellen optimal zu stimulieren (Fig.8).

Bemerkenswert dabei ist,daß bei der je nach Plasmagehalt des Inkubationsansatzes unterschiedlichen optimalen Konzentration an PHA-M der entsprechende Thymidineinbau etwa gleich hoch liegt. Offensichtlich wird also unabhängig vom Plasmagehalt des Inkubationsansatzes im Bereich der jeweils entsprechenden optimalen Mitogenkonzentration eine vergleichbare Stimulierung erzielt.

Dies spricht zum einen gegen den Einwand,daß "kaltes" Plasma-Thymidin die spezifische Aktivität des Thymidins im Inkubationsansatz signifikant verringert und somit eine nur scheinbar schlechtere Syntheserate vortäuscht. Zum anderen deutet es darauf hin,daß das Nährstoffangebot bzw. die Stimulationsbedingungen allgemein im 1 ml Volumen selbst bei hoher Plasmakonzentration - und entsprechend vermindertem Angebot an Kulturmedium - nicht nachteilig verändert sind.

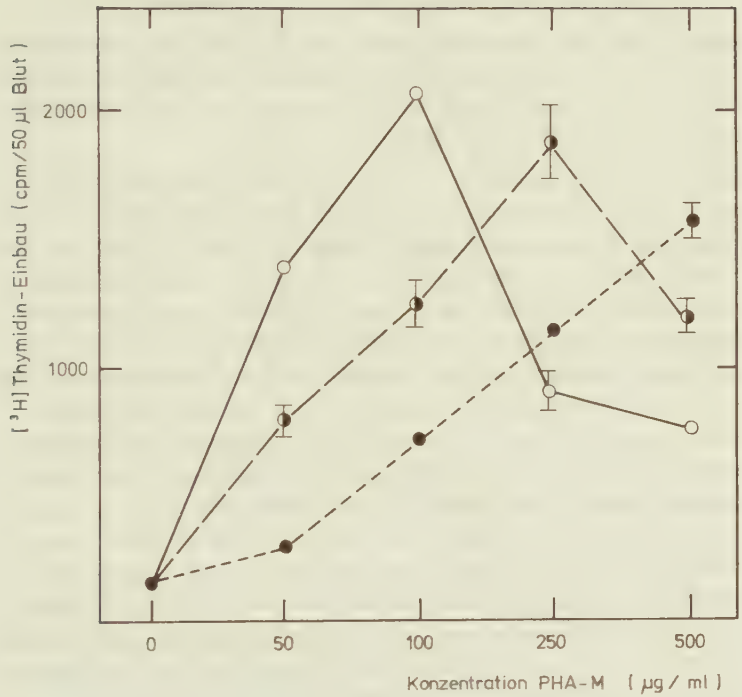


Fig.6: Einfluß der Plasmakonzentration auf die Stimulation der Blutzellen.
Ansatz: Je 50 µl Blut zu je 950 µl RPMI 1640 verschiedener PHA-M-Konzentrationen (Endkonzentrationen siehe Abszisse) und unterschiedlichen Plasmagehalts: (○)= RPMI 1640 ohne Plasmazusatz, (◑)=RPMI 1640 mit 25% Plasma, (●)=RPMI mit 50% Plasma. Nach 24 Stunden Inkubation [³H] Thymidin-Zusatz (je 50 µl; 0,5 µCi; spez. Akt. 2,0 µCi/µMol) und Weiterinkubation unter gleichen Bedingungen (37°, 10% CO_2, 7% O_2, 83% N_2) nochmals 24 Stunden lang. Danach Aufarbeitung und Auswertung (vgl. Material und Methoden).

d) Wirkung des Plasmas auf die DNA-Synthese-Phase

Anders ist die Situation,wenn das Volumen des Inkubationsansatzes nicht schon von Anfang an,sondern erst nach 24 Stunden PHA-M-Einwirkung,also unmittelbar vor Beginn der DNA-Synthese,variiert wird.

Bereits aus Fig.7 war zu sehen,daß eine Erhöhung des Inkubationsvolumens von 0,1 ml auf 1 ml durch Mediumzusatz unabhängig davon,ob diese Volumenerhöhung mit Beginn der Stimulation oder erst 24 Stunden nach Stimulationsbeginn vorgenommen wird,in jedem Fall zu einer signifikanten Steigerung der DNA-Synthese führt. Fig.8 zeigte,daß der maximale Einbau nach 48 Stunden von der Plasmakonzentration kaum beeinflußt wird,wenn das Inkubationsvolumen bereits von Anfang an nicht 0,1 ml,sondern 1 ml beträgt. Wird aber erst 24 Stunden nach Stimulationsbeginn das Inkubationsvolumen durch Mediumzusatz mit verschiedenem Plasmagehalt (0;25;50%) von 0,1 ml auf 1 ml erhöht,so zeigt sich eine deutliche Abhängigkeit des erzielten Thymidineinbaus von der jeweils mit der Volumenerhöhung gekoppelten Veränderung der Plasmakonzentration. Je höher die nach 24 Stunden eingestellte Plasmakonzentration,desto niedriger sind die Einbauraten (Fig.9).

Naheliegend ist die Vermutung,daß die 24 Stunden nach Stimulationsbeginn vorgenommene Variation der Plasmakonzentration direkte Auswirkungen auf das Ausmaß der nachfolgenden DNA-Synthese hat.

So gesehen würden steigende Plasmakonzentrationen nicht nur,wie bereits aus Fig.8 zu ersehen war,am Beginn der Stimulierung die zur optimalen Stimulation notwendige Mitogenkonzentration erhöhen,sondern darüber hinaus auch 24 Stunden nach Zugabe des Lectins die dann einsetzende DNA-Synthese beeinträchtigen.

Diese Annahme wird durch den Befund gestützt,daß in

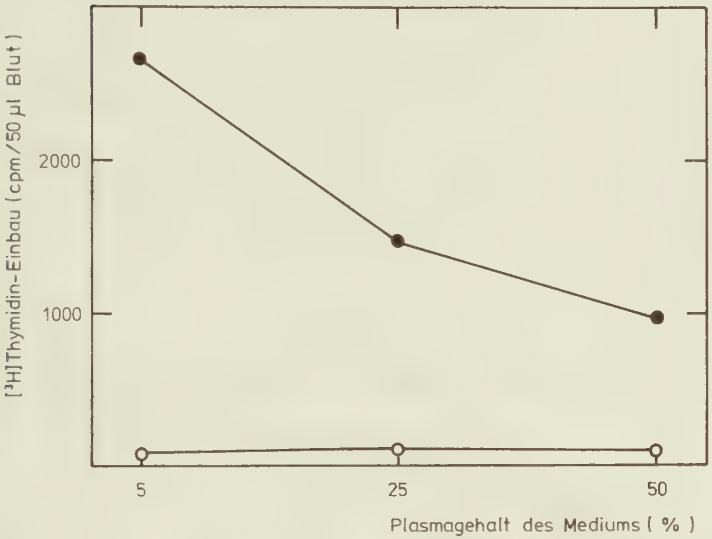


Fig.9: Einfluß verschiedener Plasmakonzentrationen auf die DNA-Synthese in PHA-M-stimulierten Blutzellen. Ansatz:Je 50 µl Blut zu je 50 µl RPMI 1640 mit 500 µg PHA-M/ml (Endkonzentration PHA-M = 250 µg/ml)(●) und ohne PHA-M (○).Inkubationsbedingungen und [^{3}H] Thymidinzusatz nach 24 Stunden wie in Legende zu Fig.2 beschrieben.Gleichzeitig mit dem Thymidinzusatz nach 24 Stunden wurde jeweils 1 ml RPMI 1640 mit verschiedenem Plasmagehalt zugegeben (Endkonzentrationen vgl. Abszisse), weitere 24 Stunden unter gleichen Bedingungen inkubiert, aufgearbeitet und gezählt (vgl. Material und Methoden).

mitogenstimulierten Inkubationsansätzen die DNA-Synthese stärker und die Dauer der DNA-Synthese-Phase länger ist, wenn 24 Stunden nach Stimulationsbeginn durch Mediumzusatz das Volumen von 0,15 ml (50 µl Blut plus 50 µl Medium plus 50 µl [^{3}H] Thymidinlösung) auf 1,15 ml erhöht wird,d.n. die Plasmakonzentration um etwa den Faktor 8 nerabgesetzt wird (Fig.10).

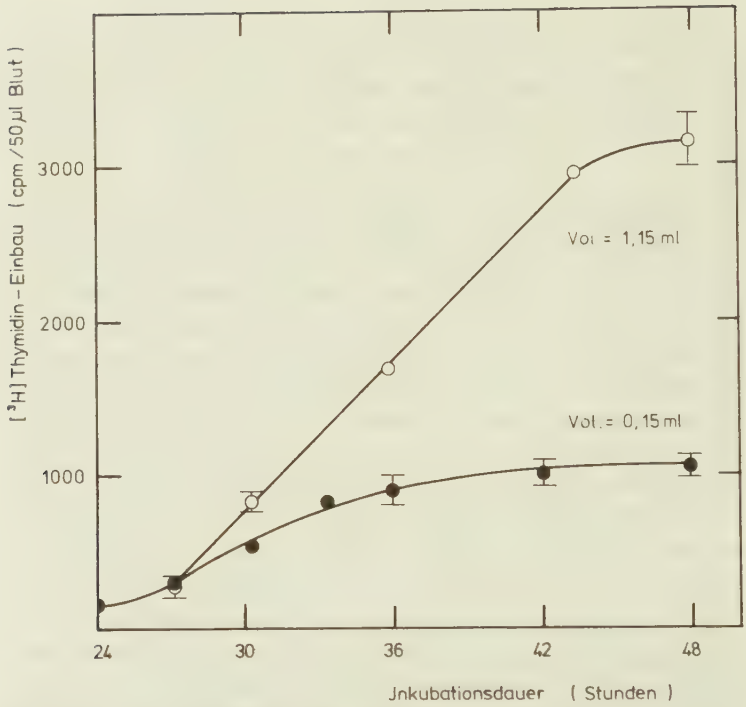


Fig.10: Vergleich der DNA-Synthese PHA-M-stimulierter Blutzellen im kleinvolumigen Ansatz (=hohe Plasmakonzentration) und im großvolumigen Ansatz (=niedrige Plasmakonzentration).
Zu je 50 µl Blut wurden je 50 µl RPMI 1640 mit PHA-M (Endkonzentration im Ansatz = 250 µg/ml) gegeben und 24 Stunden lang inkubiert. Dann Zusatz von je 50 µl [³H]Thymidin (vgl. Legende Fig.2)(●) bzw. [³H]Thymidin und 1 ml RPMI 1640 (○). Weiterinkubation unter gleichen Bedingungen (37°, 10% CO_2, 7% O_2, 83% N_2). Zu verschiedenen Zeiten - vgl. Abszisse - wurden Proben entnommen.

Wenngleich die DNA-Synthese in beiden Fällen zur selben Zeit einsetzt, ist die Syntheserate bei einem Inkubationsvolumen von nur 0,15 ml und einer hohen Plasmakonzentration von Anfang an deutlich kleiner als in den Inkubationsansätzen mit 1,15 ml Volumen und einer entsprechend ca. 8 mal kleineren Plasmakonzentration. Überdies erreicht der Thymidineinbau im 0,15 ml Volumen bereits nach 9 Stunden ein Maximum, während es im 1,15 ml Volumen erst frühestens nach 24 Stunden zur Ausbildung eines Plateaus kommt (vgl. Fig.10).

2. RNA-Synthese in Mitogen-stimulierten Blutzellen

a) Einfluß der Mitogenkonzentration

Auch das Ausmaß der RNA-Synthese in stimulierten Blutzellen wird von der Konzentration des Mitogens stark beeinflußt. Bei einem Inkubationsvolumen von 1 ml von Anfang an liegt die optimale Konzentration des Lectins sowohl im Falle von Con A als auch bei PHA-M bei einer Konzentration von 100 µg/ml (Fig.11).

Dies entspricht den unter gleichen Bedingungen erhaltenen Befunden bei der DNA-Synthese (vgl. Fig.7a). Im Gegensatz zum Thymidineinbau - vgl. Fig.3 - scheint jetzt Con A allerdings die RNA-Synthese besser stimulieren zu können als PHA-M. Auffallend ist vor allem die deutlich bessere Stimulationswirkung von Con A bei relativ niedrigen, unteroptimalen Konzentrationen. Während PHA-M bei einer Konzentration von 10 µg/ml kaum zu einer gesteigerten RNA-Synthese über das Ausmaß der auch in unstimulierten Zellen ablaufenden Grundsynthese führt, ist bei der gleichen Konzentration an Con A der [^{14}C] Uridin-Einbau gegenüber unstimulierten Zellen (Punkt ■ in Fig.11) nahezu verdoppelt.

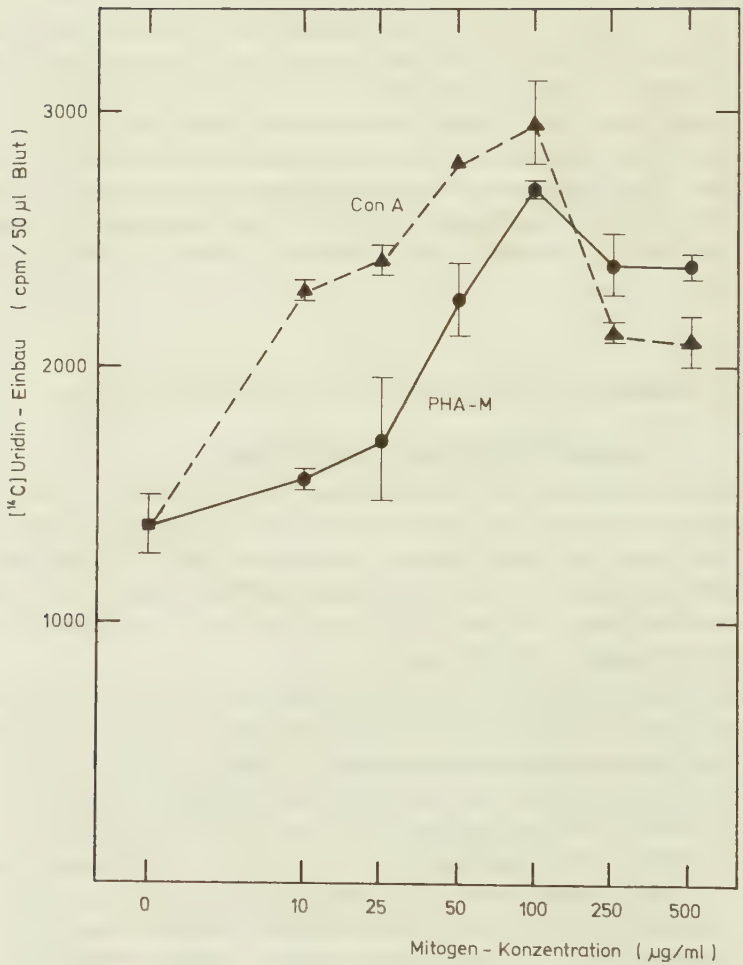


Fig.11: RNA-Synthese stimulierter Blutzellen in Abhängigkeit von der Mitogenkonzentration.
Zu je 50 µl Blut wurden je 1 ml RPMI 1640 mit [^{14}C]Uridin (0,2 µCi; spez. Akt. 400 µCi/µMol) und verschiedenen Konzentrationen an PHA-M (●) bzw. Con A (▲) gegeben (Endkonzentrationen siehe Abszisse). Nach 10 Stunden Inkubation bei 37°, 10% CO_2, 7% O_2, 83% N_2 wurde aufgearbeitet und gezählt.

b) Kinetik der RNA-Synthese

Anders als im Falle der DNA-Synthese ist die RNA-Synthese auch in unstimulierten Blutzellen nachweisbar. Unter den gegebenen Kulturbedingungen ist bei unstimulierten Zellen innerhalb der ersten 12 Inkubationsstunden ein linearer Anstieg der [^{14}C] Uridin-Incorporation, also eine konstante RNA-Syntheserate zu beobachten. Ab der 24. Stunde erreicht der Uridineinbau bei unstimulierten Zellen ein Plateau. Dies deutet darauf hin, daß es dann zu keiner weiteren Nettosynthese von RNA kommt. Aufbau und Abbau halten sich die Waage. In Gegenwart von PHA-M hingegen kommt es zu markanten Veränderungen sowohl in der Kinetik als auch im Ausmaß der RNA-Synthese (Fig.12).

In Anwesenheit von PHA-M ist die RNA-Synthese bereits von Anfang an deutlich gesteigert. Ebenso wie in unstimulierten Zellen ist der Anstieg des [^{14}C] Uridineinbaus innerhalb der ersten 12 Stunden linear. Dann aber steigt er, ganz im Gegensatz zu den Verhältnissen in Abwesenheit von Lectin, zwischen der 12. und 24. Stunde sehr steil an (vgl. Fig.12, Kurven ○ und ●).

Es liegt nahe, diesen steilen Anstieg der RNA-Syntheserate ab der 12. bis 24. Stunde mit der Zellproliferation in Verbindung zu bringen.

3. Bestimmung der Wirkdauer von PHA-M

In stimulierten Zellen ist die RNA-Synthese schon unmittelbar nach Einwirkung des Mitogens deutlich erhöht (vgl. Fig.12). Dies stimmt mit Befunden anderer Autoren überein, die in stimulierten menschlichen Lymphozyten bereits kurze Zeit, in einem Fall bereits 15 Minuten nach Zugabe des Mitogens, eine deutlich erhöhte RNA-Synthese feststellten (Pogo et al. 1966; Kay 1966; Ling 1968). Offen-

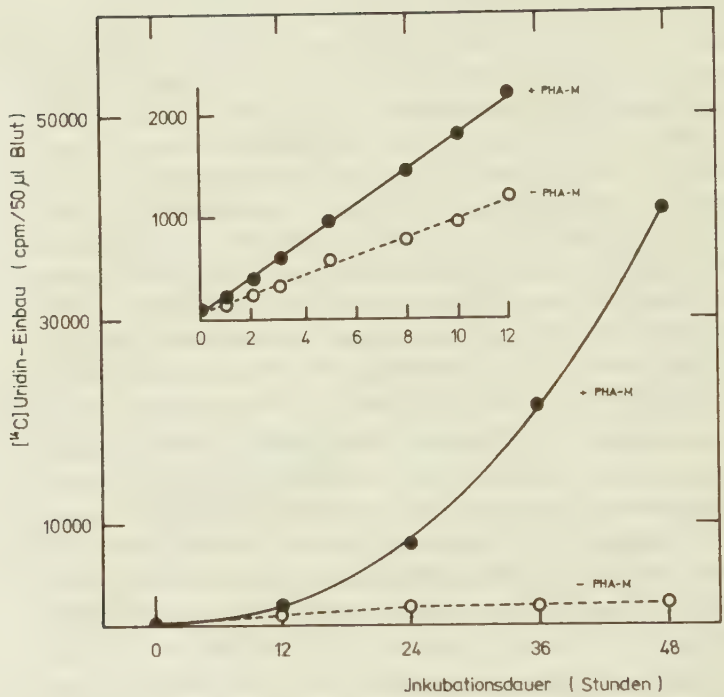


Fig.12: Kinetik der RNA-Synthese in PHA-M-stimulierten Blutzellen.
Ansatz:Je 50 µl Blut,dazu je 1 ml RPMI 1640 mit [^{14}C] Uridin (0,2 µCi;spez. Akt. 400 µCi/µMol) und 250 µg PHA-M/ml (●) (Vergleichsproben (○) ohne PHA-M). Inkubation bei 37°,10% CO_2,7% O_2,83% N_2 und Probenentnahmen zu verschiedenen Zeiten (vgl.Abszisse).

sichtlich reagiert die RNA-Synthese mitogenstimulierbarer Zellen sehr rasch auf das einwirkende Lektin.

Im Falle der DNA-Synthese ist wegen der vorausgehenden Verzögerungsperiode (Ling 1966) die Zeit,die PHA-M auf die sensitiven Zellen einwirken muß,nicht so leicht festzustellen. Hinzu kommt,daß die DNA-Synthese sowohl von der Konzentration als auch von der Art des verwendeten Mitogens stark beeinflußt wird (Ling 1968).

Im Zusammenhang mit den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit galt es,diese Fragen in etwas modifizierter Form zu klären:

Wann hat PHA-M seine auslösende Wirkung auf die später zu messende DNA-Synthese beendet?

Die anhand der Fig.7 diskutierte Konzentrationsabhängigkeit der Mitogenwirkung bietet hierfür einen experimentellen Zugang.

Die Inkubation wurde mit einem Volumen von 0,1 ml (PHA-M-Konzentration 250 µg/ml) gestartet. Nach 10 bis 630 Minuten wurde das Volumen des Ansatzes mit Medium auf 1 ml vergrößert,die Mitogenkonzentration somit auf 25 µg/ml erniedrigt. Das Experiment zeigt,daß die Herabsetzung der Mitogenkonzentration ab etwa der 120. Minute keine Abnahme der später stattfindenden DNA-Synthese mehr zur Folge hat. Die stimulierende Wirkung der hohen PHA-M-Konzentration (250 µg/ml) ist also zu diesem Zeitpunkt abgeschlossen (Fig.13).

Anders ist die Situation,wenn während der bereits laufenden DNA-Synthese das Volumen des Inkubationsansatzes erhöht wird. Wie die Kinetik der DNA-Synthese nach Volumenerhöhung zwischen der 24. und 45. Stunde der Inkubation zeigt,wird das System während der Synthesephase gegen Volumenveränderungen zunehmend empfindlicher. Während eine 10fache Erhöhung des Inkubationsvolumens bei Beginn der DNA-Synthese (24 Stunden nach Mitogenzugabe) noch die zu erwartende,deutliche Steigerung des [^{3}H] Thymidineinbaus bewirkt,ist bei Volumenvermehrung

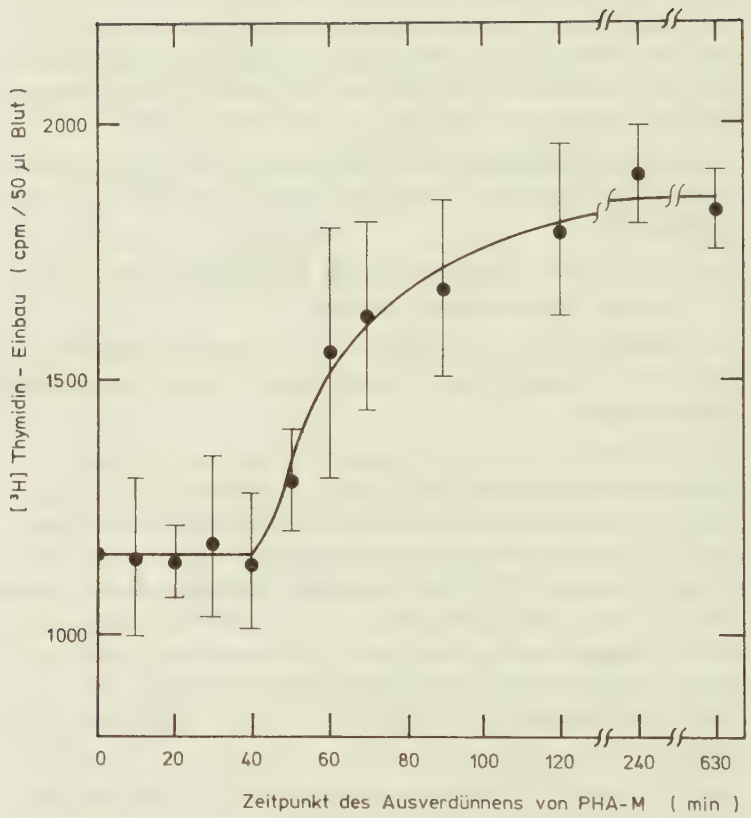


Fig.13: Bestimmung der zur optimalen Stimulierung nötigen Einwirkdauer von PHA-M.
Zu je 50 µl Blut wurden je 50 µl RPMI 1640 mit 500 µg PHA-M/ml gegeben. Die so eingestellte Optimalkonzentration von 250 µg PHA-M/ml (vgl. Fig.2) wurde durch Zusatz von 0,9 ml RPMI 1640 zu verschiedenen Zeiten - zwischen 0 und 630 Minuten nach Beginn der Stimulation - auf die weit unteroptimale PHA-M-Konzentration von 25 µg/ml (vgl. Fig.2) ausverdünnt. [³H] Thymidinzusatz (je 50 µl, 1 µCi, spez. Akt. 4,0 µCi/µMol) zum Zeitpunkt 24 Stunden, Aufarbeitung nach weiteren 24 Stunden. Inkubationsbedingungen wie in Legende Fig.2 beschrieben.

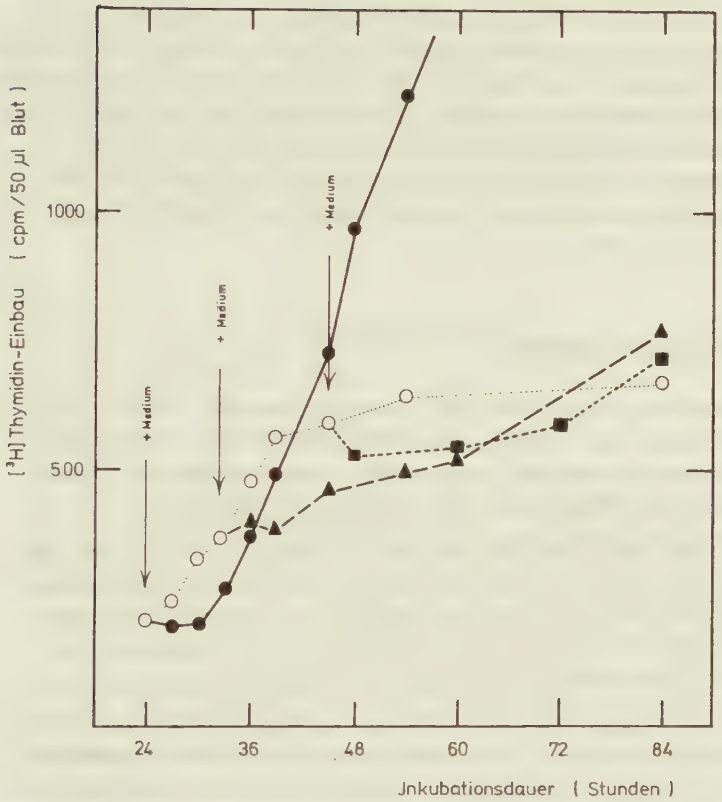


Fig.14: Wirkung einer Volumenvergrößerung des Inkubationsansatzes durch Mediumzusatz während der DNA-Synthese-Phase.
Ansatz: Je 50 µl Blut und 50 µl RPMI 1640 mit 500 µg PHA-M/ml. Inkubationsbedingungen und [³H] Thymidinzusatz nach 24 Stunden wie in Legende Fig.2 beschrieben. Zu den Zeitpunkten 24 (●), 33 (▲) und 45 (■) Stunden nach Stimulationsbeginn Zugabe von je 1,35 ml RPMI 1640 zu den 0,15 ml-Ansätzen (○). Probenentnahmen zu verschiedenen Zeiten (vgl. Abszisse).

zum Zeitpunkt 33 Stunden (mitten in der DNA-Synthese) bereits eine Verzögerung zu beobachten. Gegen Ende der DNA-Synthese,nach 45 Stunden,zeigt sich sogar ein hemmender Effekt. Hier bewirkt die Volumenzunahme durch Mediumzusatz einen vorübergehenden Rückgang der Zellmarkierung, und erst sehr viel später,nach weiteren 30 Stunden,erreicht der [^{3}H]Thymidineinbau wieder die Höhe der Vergleichsproben,deren Volumen nicht vergrößert worden war (Fig.14).

4. Zusammenfassung

Im Hinblick auf die nun zu diskutierenden Befunde zur Wirkung von Betainyl-anguidinchlorid (BAC) auf stimulierte Blutzellen lassen sich zusammenfassend folgende wichtige Ergebnisse der Vorversuche anführen:

a) Bei der Stimulierung von Blutzellen durch PHA-M hat die Plasmakonzentration einen entscheidenden Einfluß. Zu Beginn der Stimulierung wird die optimale Mitogenkonzentration von der Konzentration an Plasma im Inkubationsansatz bestimmt (vgl. Fig.8).

b) Auch auf die 24 Stunden nach PHA-M-Zugabe einsetzende DNA-Synthese ist ein deutlicher Einfluß der Plasmakonzentration festzustellen. Steigende Konzentrationen hemmen den [^{3}H]Thymidineinbau (vgl. Fig.9); mit sinkender Plasmakonzentration wird sowonl die Intensität als auch die Dauer der DNA-Synthese größer (vgl. Fig.10).

c) Mindestens 2 Stunden muß PHA-M in optimaler Konzentration auf die Blutzellen einwirken,um diese zu einer maximalen DNA-Synthese zu veranlassen. Danach,in der Zeit zwischen der 2. Stunde und dem Beginn der DNA-Synthese zur 24. Stunde,ist das System gegen eine Er-

niedrigung der PHA-M-Konzentration unempfindlich (vgl. Fig.13).

d) Die RNA-Synthese in PHA-M-stimulierten Blutzellen zeigt zwei deutlich verschiedene Phasen. Innerhalb der ersten 12 Stunden ist die Syntheserate konstant, später zeigt sie - vermutlich im Zusammenhang mit der dann einsetzenden DNA-Synthese - einen steilen, nichtlinearen Anstieg (vgl. Fig.12).

II. WIRKUNG VON BETAINYL-ANGUIDINCHLORID (BAC) AUF DIE DNA-SYNTHESE

1. Konzentrationsabhängigkeit

BAC hat einen starken Einfluß auf die DNA-Synthese in PHA-M-stimulierten humanen Blutzellen. Bereits in der sehr geringen Konzentration von nur 0,01 µg/ml (entsprechend $1{,}33 \times 10^{-8}$m) kann es auch in Gegenwart optimaler Mitogenkonzentrationen die DNA-Synthese vollständig blockieren; 0,003 µg/ml (entsprechend 5×10^{-9}m) des Hemmstoffs führen zu einer 50 %igen Hemmung des [^{3}H]Thymidineinbaus. Diese außerordentlich starke Hemmwirkung des Trichothecanderivats BAC steht im deutlichen Gegensatz zu der geringen Wirkung des Sesquiterpens 114-HPS-1 (Ovalicin), eines überaus starken Inhibitors der Stimulation von Maus-Lymphozyten (Weiner, Diplomarbeit Würzburg 1973). Auf die Stimulation von humanen Blutzellen (periphere Lymphozyten) hat 114-HPS-1 aber unter unseren Bedingungen (ungewöhnlich hohe Mitogenkonzentration) kaum einen Einfluß. Erst bei vergleichsweise sehr hohen Konzentrationen (mehr als 5 µg/ml) ist die DNA-Synthese merklich beeinträchtigt. 100 µg 114-HPS-1/ml sind nötig, um sie vollständig zu blockieren. In unserem System ist BAC also um etwa 4 Größenordnungen wirksamer

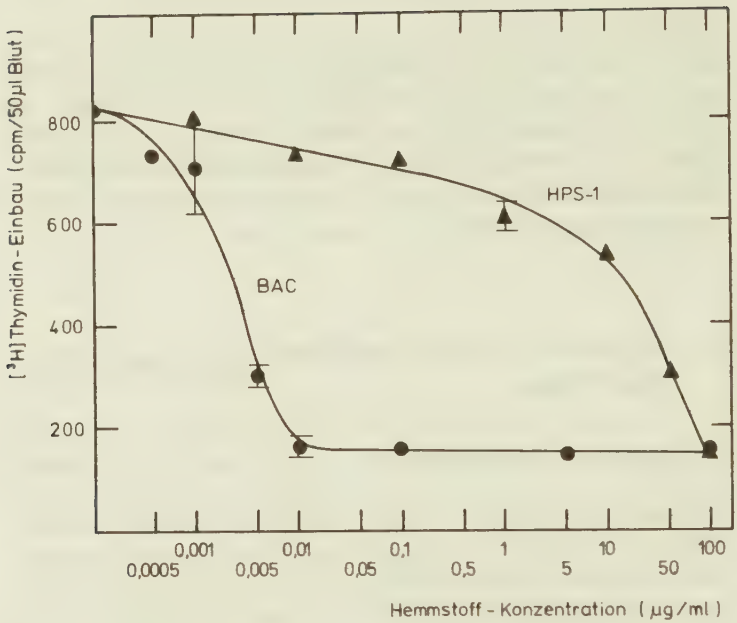


Fig.15: Konzentrationsabhängigkeit der Hemmwirkung von Betainyl-anguidinchlorid (BAC) und 114-HPS-1 (Ovalicin) auf die Stimulation von Blutzellen durch PHA-M. Ansatz: Je 50 µl Blut zu je 50 µl RPMI 1640 mit 500 µg PHA-M/ml und verschiedenen Konzentrationen an BAC (●) bzw. 114-HPS-1 (▲). [³H]Thymidinzusatz, Inkubationsbedingungen und Aufarbeitung siehe Legende Fig.2.

als Ovalicin (Fig.15).

Eine sehr ähnliche Dosis-Effektkurve des BAC findet man auch in Abwesenheit von Erythrozyten (Fig.16). Bei diesem Versuch wurden die Erythrozyten, wie in Material und Methoden beschrieben, entfernt. Die in diesem Fall zur 50 %igen Hemmung der DNA-Synthese nötige BAC-Konzentration liegt bei 0,001 µg/ml und ist somit etwa dreimal kleiner als in Gegenwart von Erythrozyten.

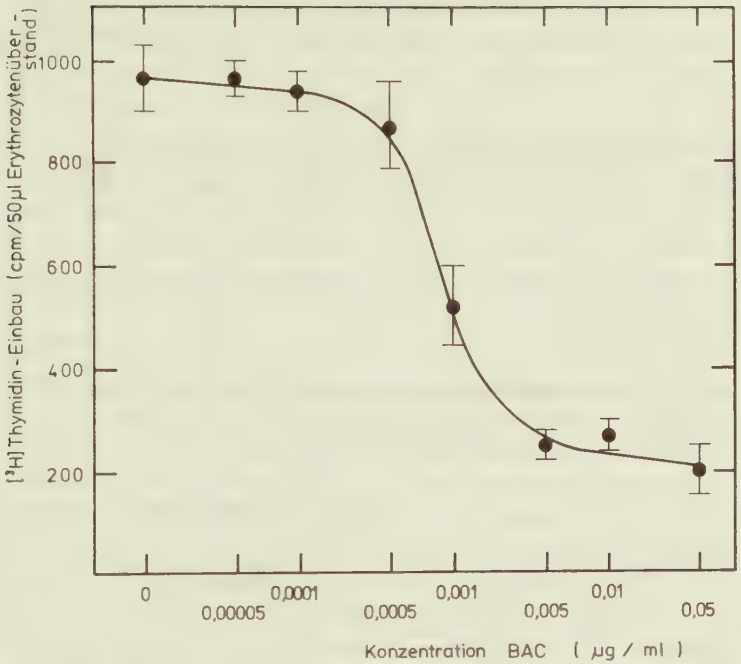


Fig.16: Konzentrationsabhängigkeit der Hemmwirkung von BAC auf die PHA-M-Stimulation von Blutzellen nach Abtrennung der Erythrozyten.
Nach 90 Minuten Stehen bei 37° und Absitzen der Erythrozyten wurde vom Blut der Leukozyten-haltige Überstand abgezogen (vgl. Material und Methoden) und 1:1 mit RPMI 1640 verdünnt. Je 100 µl dieser Lösung wurden zu je 100 µl RPMI 1640 mit 500 µg PHA-M/ml und verschiedenen Konzentrationen an BAC gegeben und bei 37°, 10% CO_2, 7% O_2, 83% N_2 inkubiert. [³H]Tnymidinzugabe nach 24 Stunden (je 50 µl; 0,5 µCi, spez. Akt. 2,0 µCi/µMol), Weiterinkubation für nochmals 24 Stunden, dann Aufarbeitung.

Die Erythrozyten haben also im Inkubationsansatz nur einen geringfügigen Einfluß auf die Hemmwirkung des BAC.

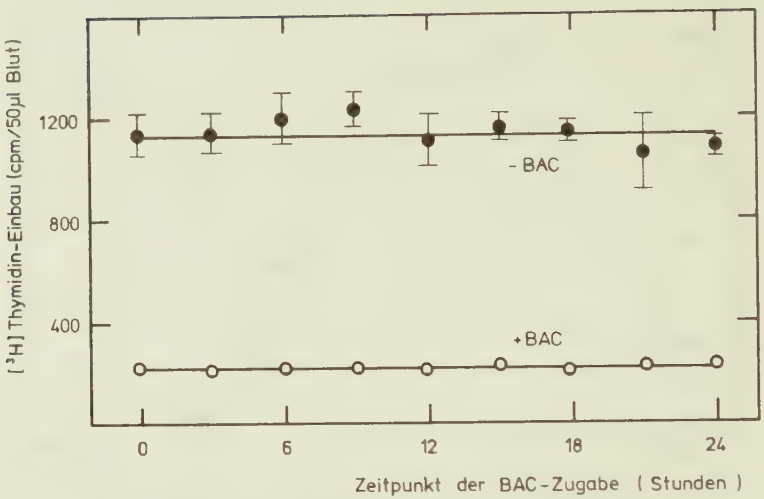


Fig.17: Wirkung von BAC auf die Stimulation von Blutzellen in verschiedenen Stimulationsstadien.
Je 50 µl RPMI 1640 mit 500 µg PHA-M/ml wurden zu je 50 µl Blut gegeben und innerhalb der ersten 24 Inkubationsstunden (bis zum [³H]Thymidinzusatz) zu verschiedenen Zeiten - vgl. Abszisse - je 5 µl RPMI 1640 mit 250 µg PHA-M/ml und 2 µg BAC/ml (Endkonzentration BAC in den Ansätzen=0,1 µg/ml) (○) bzw. ohne BAC (●) zugesetzt. [³H]Thymidinzugabe nach 24 Stunden, Weiterinkubation für nochmals 24 Stunden. Bedingungen wie in Legende zu Fig.2 beschrieben.

2. Wirkung von BAC in den verschiedenen Phasen der Stimulation von Blutzellen

Wird BAC zu den verschiedenen Phasen der Stimulation zugesetzt, d.h. unmittelbar nach Zugabe des Lectins bis zum Beginn der DNA-Synthese, so zeigt sich, daß dieser Hemmstoff jegliche DNA-Synthese verhindert, solange er noch vor Beginn des [³H]Thymidineinbaus zugesetzt wird (Fig.17).

Aber auch innerhalb der DNA-Synthesephase kommt es nach Zusatz von BAC (Endkonzentration jeweils 0,1 µg/ml) in jedem Fall binnen kurzer Zeit zum Abbruch der bereits laufenden DNA-Synthese (Fig.18).

Diese Befunde zeigen,daß sich die Empfindlichkeit des Systems gegenüber BAC in den einzelnen Phasen der Stimulation nicht signifikant ändert. Mit 0,1 µg BAC/ml - dies ist die zehnfache Konzentration,die zu einer totalen Hemmung notwendig ist (vgl. Fig.15) - wird die Indikatorreaktion der PHA-M-Stimulation ([^{3}H] Thymidineinbau) immer blockiert.

Die Zeit zwischen Zugabe und Hemmwirkung kann nur kurz sein. Dies zeigt die Tatsache,daß die Kurve b (Fig.18), welche die Zeitabhängigkeit der Wirkung des Hemmstoffs auf den nach 48 Stunden zu messenden Thymidineinbau wiedergibt,nur geringfügig über der Kurve a (Fig.18) liegt,die den zeitlichen Verlauf der ungehemmten DNA-Synthese widerspiegelt.

3. Kinetik der DNA-Synthese-Hemmung

36 Stunden nach Zugabe des Mitogens,also 12 Stunden nach Beginn der DNA-Synthese,wurde BAC in verschiedenen Konzentrationen (Endkonzentrationen jeweils 0,1;1;10 µg/ml) zugesetzt und in kurzen Abständen der Einbau des nach 24 Stunden zugegebenen [^{3}H] Thymidins verfolgt. Dabei wurde ein Inkubationsvolumen von 1,1 ml gewählt (Zusatz von je 1 ml Medium zu den 0,1 ml Ansätzen zum Zeitpunkt 24 Stunden),um durch die so erzielte Verringerung der Plasmakonzentration eine stärkere und länger andauernde DNA-Synthese der stimulierten Blutzellen zu erreichen. Das Ergebnis zeigt,daß BAC in allen gewählten Konzentrationen binnen 1,5 bis 2 Stunden nach Zusatz zur laufenden DNA-Synthese den Abbruch des [^{3}H] Thymidineinbaus bewirkt (Fig.19).

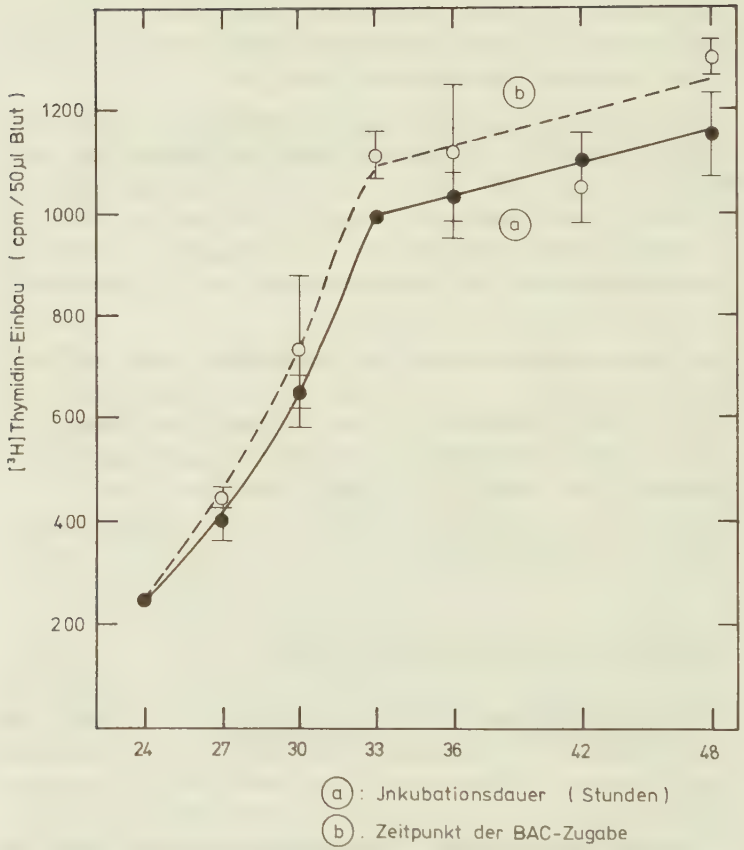


Fig.18: Wirkung von BAC auf PHA-M-stimulierte Blutzellen zu verschiedenen Zeitpunkten der DNA-Syntnese-Phase. Je 50 µl RPMI 1640 mit 500 µg PHA-M/ml wurden zu je 50 µl Blut gegeben, nach 24 Stunden Inkubation (5% CO_2, 7% O_2, 83% N_2) [³H]Thymidin zugesetzt (je 50 µl; 0,5 µCi, spez.Akt. 2,0 µCi/µMol). Nachfolgend, zwischen der 24. und 48. Stunde (vgl. Abszisse) wurden Proben zur Kontrolle der laufenden DNA-Syntnese entnommen (●) bzw. je 5 µl RPMI 1640 mit 3 µg BAC/ml (Endkonzentration in den Ansätzen=0,1 µg BAC/ml) zugegeben, bis zum Zeitpunkt 48 Stunden weiterinkubiert (○) und dann aufgearbeitet.

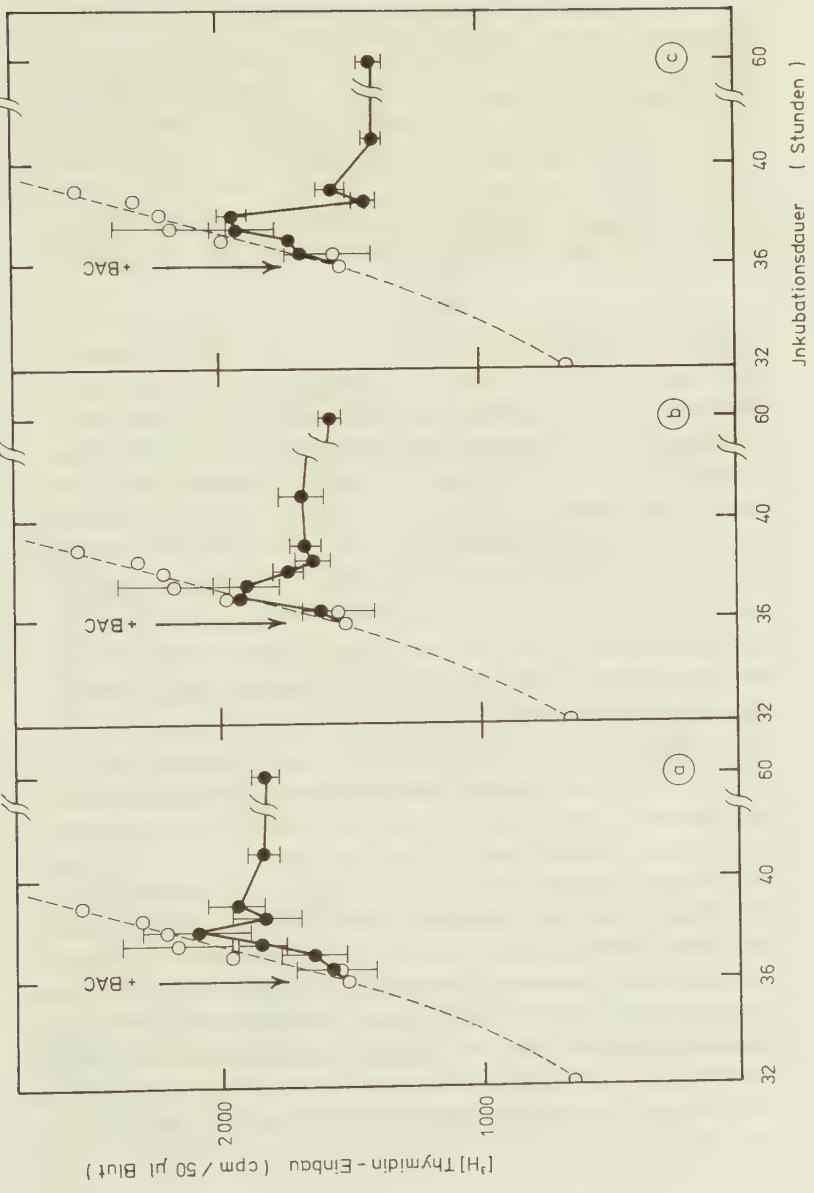


Fig.19

Legende s.S.

Fig.19: Kinetik der Hemmwirkung von BAC auf die DNA-Synthese in stimulierten Blutzellen.
Ansatz analog Fig.18, jedoch bei größerem Inkubationsvolumen (Zusatz von je 1 ml RPMI 1640 zum Zeitpunkt 24 Stunden). BAC wurde erst zum Zeitpunkt 36 Stunden, also 12 Stunden nach [^{3}H] Thymidinzusatz, in Form von je 10 µl RPMI 1640 mit a) 11,5 µg BAC/ml, b) 115 µg BAC/ml, c) 1150 µg BAC/ml (Endkonzentrationen jeweils 0,1; 1 und 10 µg BAC/ml) zugesetzt. Vergleichsproben erhielten je 10 µl RPMI 1640 ohne BAC. In zunächst halbstündigen, später größeren Abständen - vgl. Abszisse - wurden Proben mit (●) und ohne BAC (○) entnommen und analysiert.

Wie ein entsprechender Kontrollversuch beweist, geht die Hemmung der DNA-Synthese tatsächlich allein auf die Wirkung von BAC zurück. Zur homogenen Verteilung des Hemmstoffs im Inkubationsvolumen war es nämlich nötig, die Proben nach BAC-Zusatz vorsichtig zu schütteln und damit gleichzeitig auch die abgesetzten Zellen aufzuwirbeln. Der Kontrollversuch aber zeigt, daß diese Operation keinen Einfluß auf die Kinetik der DNA-Synthese hat (Fig.20).

Offensichtlich sind also die stimulierten Zellen während der laufenden DNA-Synthese gegenüber solchen Manipulationen unempfindlich.

Die Tatsache, daß die Zeitspanne zwischen BAC-Zusatz und Wirkung auf die DNA-Synthese bei den verschiedenen Konzentrationen etwa gleich lang ist (vgl. Fig.19a,b und c), macht deutlich, daß es sich hierbei wohl nicht um einen Zeitbedarf handeln kann, der etwa durch die Diffusion des Hemmstoffs von der Außenseite der Zellmembranen in den Zellkern verursacht wird. Dann wäre nämlich zu erwarten, daß die Zeit zwischen Zusatz und Wirkung bei einer Hemmstoffkonzentration von 10 µg/ml gegenüber der bei einer Konzentration von nur 0,1 µg/ml wesentlich verringert ist. Diese Frage wird im Zusammenhang mit der Wirkung von BAC auf die RNA-Synthese nochmals diskutiert werden.

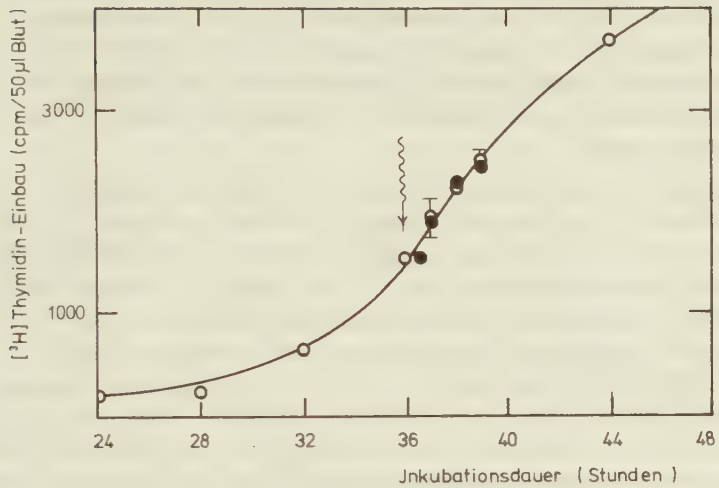


Fig.20: Prüfung der Empfindlichkeit des Bodensatzes stimulierter, DNA-synthetisierender Blutzellen in den Kulturgefäßen gegen Aufwirbeln (Kontrollversuch zu Fig.19).
Ansatz und Bedingungen wie bei Fig.19; anstelle von BAC-Lösung wurde zum Zeitpunkt 36 Stunden ein gleiches Volumen RPMI 1640 zugesetzt und wie bei den Proben in Fig.19 der Zellbodensatz einmal vorsichtig aufgewirbelt. Danach Weiterinkubation und Messung des (^{3}H)Thymidineinbaus in den aufgewirbelten (●) und in den unbehandelt gebliebenen Proben (○).

Auffällig ist auch der Befund, daß nach erfolgter BAC-Hemmung der DNA-Synthese offensichtlich weniger DNA in den Zellen vorliegt als noch unmittelbar vor der Blockierung (vgl. Fig.19). Angesichts der Streubreite des Meßverfahrens messen wir dieser Aussage allerdings keine zu große Bedeutung bei. Immerhin wäre es aber denkbar, daß die Differenz zwischen dem Spitzenwert des Thymidineinbaus 1,5 bis 2 Stunden nach Zusatz von BAC und dem später verbleibenden Restniveau durch eine Art von metabolisch aktiver DNA verursacht wird. Diese würde

nach Blockierung der DNA-Synthese noch abgebaut werden, während der weitaus überwiegende Teil der Gesamt-DNA aufgrund seiner bekannten metabolischen Stabilität unverändert liegen bleibt. Derart metabolisch instabile DNA könnten beispielsweise die bekannten Okazaki-Fragmente sein.

Der metabolisch stabile Anteil der DNA wird dadurch offensichtlich, daß die radioaktive Markierung der Zellen 2,5 bis 3 Stunden nach Hemmstoffzusatz in der Folgezeit praktisch unverändert bleibt (vgl. Fig.19). Dieser Befund zeigt, daß die Zellen unter der Wirkung von BAC offenbar nicht zerstört werden, sondern lediglich der Nucleinsäurestoffwechsel unterbrochen ist. Käme es nämlich unter dem Einfluß des Hemmstoffs zu einer Lyse der Zellen, so wäre ein Abbau auch der metabolisch stabilen DNA durch Lysosomenwirkung und andere Mechanismen zu erwarten. Auch dieses Problem wird bei der RNA-Synthese noch einmal diskutiert werden.

III. WIRKUNG VON BAC AUF DIE RNA-SYNTHESE

1. Konzentrationsabhängigkeit

Wie bereits in den Vorversuchen gezeigt, sind bei der RNA-Synthese PHA-M-stimulierter Blutzellen zwei Phasen zu unterscheiden. Während innerhalb der ersten 12 Stunden ein zwar gesteigerter, aber ebenso wie bei der unstimulierten Grundsynthese linearer Anstieg des [^{14}C] Uridineinbaus zu beobachten ist, kommt es zwischen der 12. und 24. Stunde der Inkubation, also etwa mit dem Einsetzen der DNA-Synthese, zu einem außerordentlich starken Anstieg der RNA-

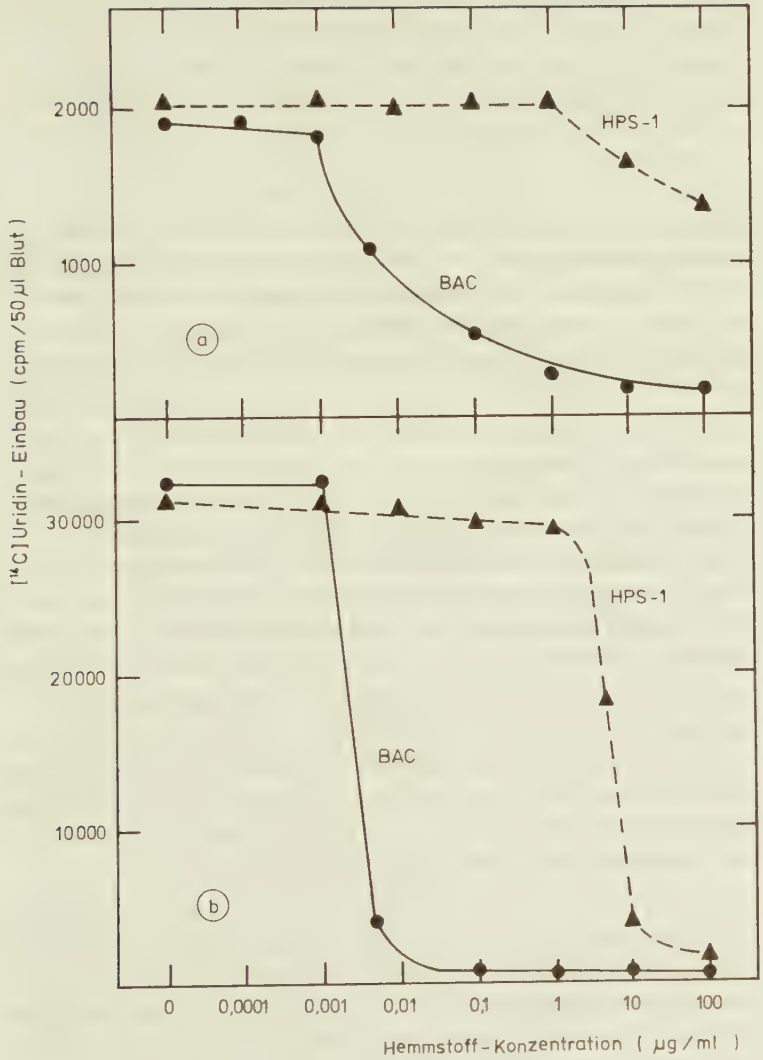


Fig.21 (Legende siehe folgende Seite)

Fig.21: Vergleich der Hemmwirkung von BAC und 114-HPS-1 auf die PHA-M-stimulierte RNA-Synthese in Blutzellen. Zu je 1 ml RPMI 1640 mit 250 µg PHA-M/ml, [^{14}C] Uridin (0,2 µCi, spez.Akt. 400 µCi/µMol) und verschiedenen Konzentrationen an BAC (●) bzw. 114-HPS-1 (▲) wurden je 50 µl Blut gegeben (Endkonzentrationen der Hemmstoffe siehe Abszisse). Aufarbeitung nach a) 12 Stunden und b) 48 Stunden Inkubation (37°, 10% CO_2, 7% O_2, 83% N_2).

Syntheserate (vgl. Fig.12). Deshalb wurde die Konzentrationsabhängigkeit der BAC-Wirkung auf die RNA-Synthese sowohl innerhalb der linearen Synthesephase nach 12-stündiger Einwirkung des Hemmstoffs (Fig.21 a) als auch in der nichtlinearen Phase nach 48-stündiger Einwirkung getestet (Fig.21 b).

Analog den Verhältnissen bei der DNA-Synthese (vgl.Fig.15) wird auch die RNA-Synthese in beiden Phasen selbst bei optimaler Mitogenkonzentration schon durch geringe BAC-Konzentrationen stark gehemmt. 114-HPS-1 hingegen ist vergleichsweise sehr wenig wirksam. In diesem Fall bewirkt letzteres, anders als bei der DNA-Synthese, selbst in höchster Konzentration (100 µg 114-HPS-1/ml) nur eine partielle Hemmung der RNA-Synthese (vgl. Fig.21 Kurven ▲).

Die Hemmung beginnt in jedem Fall bei einer Hemmstoffkonzentration von 0,001 µg BAC/ml. 50 % Hemmung der RNA-synthese innerhalb der ersten 12 Stunden in stimulierten Zellen werden mit 0,005 µg BAC/ml erreicht (vgl. Fig.21a). Dies stimmt recht gut mit dem entsprechenden Wert für die DNA-Synthese (0,003 µg/ml; vgl. Fig.15) überein.

Im Falle der RNA-Synthese über einen Zeitraum von 48 Stunden sind die Verhältnisse deswegen etwas unübersichtlicher, weil in dieser Phase, wie bereits im Zusammenhang mit Fig.12 diskutiert, ein nichtlinearer Anstieg der RNA-Synthese einsetzt. In dieser Phase ist eine 50 %ige Hemmung bei 0,003 µg BAC/ml zu beobachten (vgl. Fig.21b). Auch dieser Wert entspricht den Befunden bei der DNA-Synthese.

Ein deutlicher Unterschied in der Empfindlichkeit zwischen der DNA- und RNA-Synthese zeigt sich hingegen im Bereich höherer Hemmstoffkonzentrationen. Während in Gegenwart von 0,01 µg BAC/ml die DNA-Synthese bereits vollkommen blockiert ist (vgl. Fig.15),erreicht die RNA-Synthese bei dieser Konzentration noch einen Wert von 40 %,verglichen mit der mitogenstimulierten Synthese in Abwesenheit von BAC. Erst ab einer Konzentration von 10 µg BAC/ml und mehr ist die RNA-Synthese total blockiert (vgl. Fig.21a).

Diese Beobachtung spricht dafür,daß die DNA-Synthese durch den Hemmstoff direkter betroffen wird als die RNA-Synthese.

2. Kinetik der RNA-Synthese-Hemmung

Zur Verfolgung der Kinetik der RNA-Synthese-Hemmung wurde prinzipiell die gleiche Methode angewendet wie schon bei der DNA-Synthese (vgl. Fig.19). Fünf Stunden nach Inkubationsbeginn,also während der frühen,linearen RNA-Synthesephase (vgl. Fig.12),wurde den stimulierten Zellkulturen BAC in den Endkonzentrationen 1, 10 und 100 µg/ml zugesetzt. Bei diesen Konzentrationen ist in jedem Fall eine praktisch totale Hemmung der RNA-Synthese zu erwarten (vgl. Fig.21 a). Dann wurde in halbstündigen Abständen der [^{14}C]Uridineinbau gemessen (Fig.22).

Auch im Fall der RNA-Synthese entspricht die Kinetik nach Zusatz von BAC noch 2 Stunden lang völlig der in Zellkulturen ohne Hemmstoff. Dann aber kommt es plötzlich zu einer abrupten und starken Hemmung,und nachfolgend zu einer deutlichen Abnahme der radioaktiv markierten RNA. Wie schon bei der DNA-Synthese-Hemmung beobachtet (vgl. Fig.19),ist auch hier die Zeit zwischen Zusatz des Hemmstoffes und der Wirkung unabhängig von

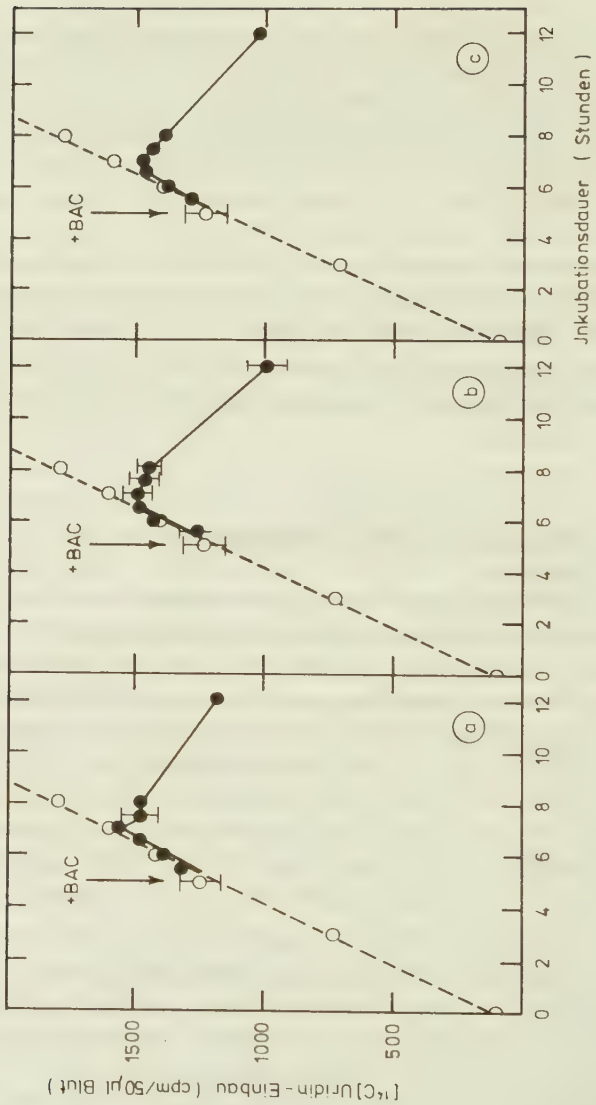


Fig.22 (Legende siehe nächste Seite)

Fig.22: Kinetik der Hemmwirkung von BAC auf die RNA-Synthese in stimulierten Blutzellen.
Zu je 1 ml RPMI 1640 mit 250 µg PHA-M/ml und [^{14}C]Uridin (0,2 µCi, spez.Akt. 400 µCi/µMol) wurden 50 µl Blut gegeben. Nach 5 Stunden Inkubation bei 37°, 10% CO_2, 7% O_2 und 83% N_2 Zusatz von je 20 µl RPMI 1640 mit a) 50, b) 500, c) 5000 µg BAC/ml (Endkonzentrationen entsprechend 1, 10, 100 µg BAC/ml). Durch leichtes Schütteln der Kulturröhrchen (Aufwirbeln des Zellbodensatzes) wurde BAC gleichmäßig in den Inkubationsansätzen verteilt und nach Weiterinkubation zu verschiedenen Zeiten (vgl. Abszisse) Proben mit BAC (●) sowie Vergleichsproben ohne Hemmstoff (O) entnommen und aufgearbeitet.

der Hemmstoffkonzentration. Sie beträgt immer 2 Stunden. Dies spricht wieder gegen einen Diffusionsprozeß vom Medium durch die Zellmembran bis an den Wirkort im Zellinneren als Ursache für die Verzögerung der BAC-Wirkung.

Durch einen entsprechenden Kontrollversuch wurde auch hier, analog wie bei der DNA-Synthese (vgl. Fig.20), sichergestellt, daß die beobachteten Effekte tatsächlich ausschließlich auf die Wirkung von BAC im Kulturansatz zurückzuführen sind. Die beim Zusatz des Hemmstoffs während der laufenden RNA-Synthese notwendigen Manipulationen (Schütteln, Aufwirbeln des Zellbodensatzes etc.) beeinträchtigen die RNA-Synthese nicht (Fig.23).

In den bisher geschilderten Versuchen war BAC in verschiedenen Konzentrationen zu einer bestimmten Zeit innerhalb der RNA-Synthesephase zugesetzt worden. Weitere Aufschlüsse über die Ursache der beobachteten mehrstündigen Latenzzeit des Hemmstoffs erhält man, wenn BAC in einer einzigen Konzentration zu verschiedenen Zeiten innerhalb der RNA-Synthesephase zugesetzt wird (Fig.24 a und b).

Es zeigt sich, daß auch die RNA-Synthese in allen Phasen gegenüber der einwirkenden Konzentration von BAC empfindlich ist. In jedem Fall - sowohl in der Anfangsphase als auch in der nichtlinearen Folgephase - wird

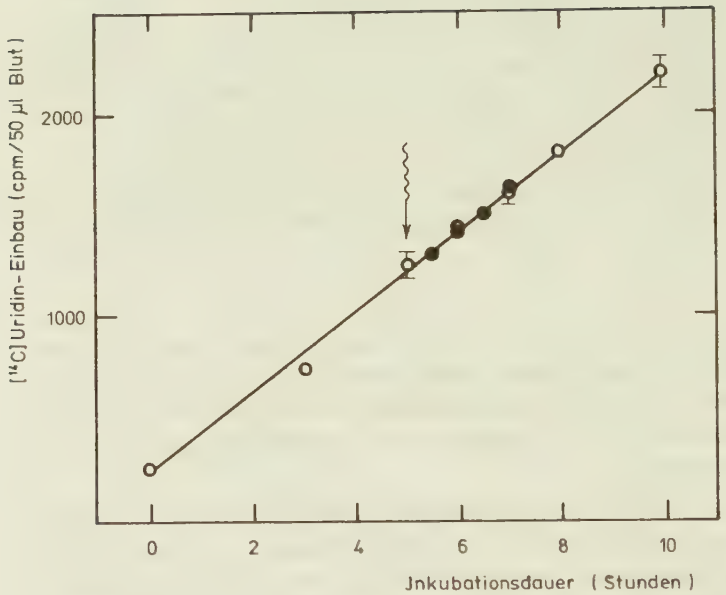


Fig.23: Prüfung der Empfindlichkeit des Bodensatzes stimulierter,RNA-synthetisierender Blutzellen gegen Aufwirbeln (Kontrollversuch zu Fig.22). Bedingungen wie in Fig.22;statt BAC-Zusatz wurde zum Zeitpunkt 5 Stunden ein gleiches Volumen RPMI 1640 zugegeben und wie bei den Proben in Fig.22 der Zellbodensatz einmal vorsichtig aufgewirbelt.Dann Weiterinkubation und Messung des [^{14}C]Uridineinbaus in den aufgewirbelten (●) und in unbehandelt gebliebenen Proben (○).

die RNA-Synthese durch 1 µg BAC/ml blockiert. Später kommt es zu einer rapiden Verminderung der gesamten Incorporation von Uridin in säureunlösliches Zell-Lysat. Offensichtlich wird die noch vorhandene RNA wegen ihrer metabolischen Instabilität mehr und mehr abgebaut.

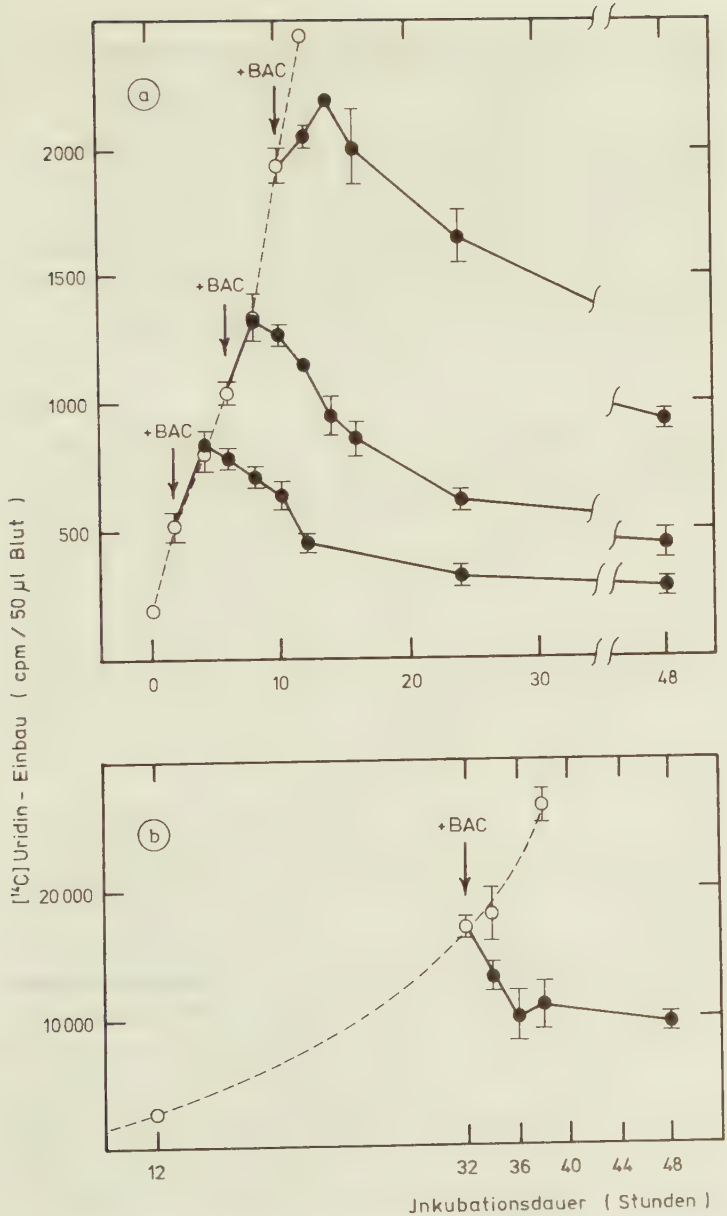


Fig.24 (Legende siehe folgende Seite)

Fig.24: Kinetik der Hemmwirkung von BAC auf die RNA-Synthese in stimulierten Blutzellen.
Je 50 µl Blut wurden zu je 1 ml RPMI 1640 mit 250 µg/ml PHA-M und [^{14}C] Uridin (0,2 µCi, spez.Akt. 400 µCi/µMol) gegeben und bei 37°, 10% CO_2, 7% O_2, 83% N_2 inkubiert. Nach 2, 6 und 10 (Fig.24a) bzw. 32 Stunden (Fig.24b) wurden jeweils je 10 µl einer Lösung von 100 µg BAC/ml RPMI 1640 zugesetzt (Endkonzentration an BAC in den Ansätzen=1 µg/ml), durch vorsichtiges Schütteln (Aufwirbeln des Bodensatzes) gleichmäßig verteilt, und während der Weiterinkubation zu verschiedenen Zeiten die [^{14}C] Uridin-Incorporation in den BAC-haltigen (●) und in Vergleichsproben ohne Hemmstoff (○), denen statt BAC-Lösung ein gleiches Volumen RPMI zugesetzt worden war, gemessen.

Auffällige Unterschiede finden sich jetzt allerdings im Zeitbedarf des Hemmstoffs für die Blockierung der RNA-Synthese. Beträgt diese Latenzzeit bei Zusatz von BAC innerhalb der ersten 6 Stunden der RNA-Synthesephase (vgl. Fig.24a) 2 Stunden, so ist sie nach 10 Stunden RNA-Synthese viel kleiner und nach 32 Stunden - also weit im Bereich der nicht mehr linearen Synthesephase (vgl. Fig.12) - zu kurz, um mit der hier angewendeten Versuchstechnik erfaßt werden zu können (vgl. Fig.24b).

Diese Beobachtungen legen die Vermutung nahe, daß BAC die RNA-Synthese nicht direkt, sondern indirekt beeinflußt. Eine indirekte Beeinflussung liegt vor, wenn beispielsweise die Größe des Nucleotid-Pools in der Zelle vom Hemmstoff beeinflußt würde. Setzt man voraus, daß in allen Phasen der RNA-Synthese der Nucleotid-Pool einer stimulierten Zelle annähernd gleich groß ist, so muß man erwarten, daß bei einem plötzlichen Stop der Nucleotidsynthese (Zufluß zum Pool) der dann noch vorhandene Nucleotidvorrat um so schneller aufgebraucht sein wird, je größer die jeweilige Nucleinsäurebiosyntheserate ist. Damit käme diese auch rascher zum Erliegen. Diese Hypothese erklärt, warum die BAC-Wirkung auf die RNA-Synthese in der anfänglichen linearen Phase 2 Stunden braucht, aber später, bei Erhöhung der RNA-Syntheserate, immer schneller einsetzt (vgl. Fig.24 a und b).

IV. WIRKUNG VON BAC AUF DIE RNA-SYNTHESE IN UNSTIMULIERTEN BLUTZELLEN

Aus den vorausgehenden Experimenten geht hervor,daß BAC ein außerordentlich starker Hemmstoff der DNA- und RNA-Synthese in mitogenstimulierten Blutzellen ist. Ungeklärt blieb noch die Frage der Spezifität dieser Hemmung. Denn es blieb offen,ob BAC die Indikatorreaktion zum Nachweis der Stimulierung sensitiver Blutzellen durch PHA-M oder nur die Stimulierung selbst blockiert.

Eine Antwort liefert die Untersuchung der Wirkung von BAC auf die RNA-Synthese unstimulierter Blutzellen. Hierbei zeigt sich,daß auch diese durch den Hemmstoff vollständig unterdrückt wird. Zum Vergleich wurden auch hier Versuche mit 114-HPS-1 durchgeführt (Fig.25).

Die erhaltenen Ergebnisse sprechen eindeutig gegen eine spezifische Wirkung von BAC nur auf stimulierte Zellen. Sie weisen vielmehr darauf hin,daß BAC ein generell wirksamer Hemmstoff der Nucleinsäuresynthese in höheren Zellen ist. Auf die Frage der Zellspezifität von BAC wird später noch eingegangen werden.

V. REVERSIBILITÄT DER WIRKUNG VON BAC AUF DIE DNA-SYNTHESE

Schon die Diskussion der Ergebnisse in Fig.19 hatte Hinweise dafür erbracht,daß BAC zwar die Synthese von DNA blockiert,die Zellen aber offensichtlich nicht abtötet. Damit ergab sich die Frage,ob die Hemmung der DNA-Synthese reversibel ist.

Die Voraussetzungen für eine experimentelle Klärung dieses Problems sind in dem hier verwendeten System stimulierter Blutzellen besonders günstig: Die Wirkung

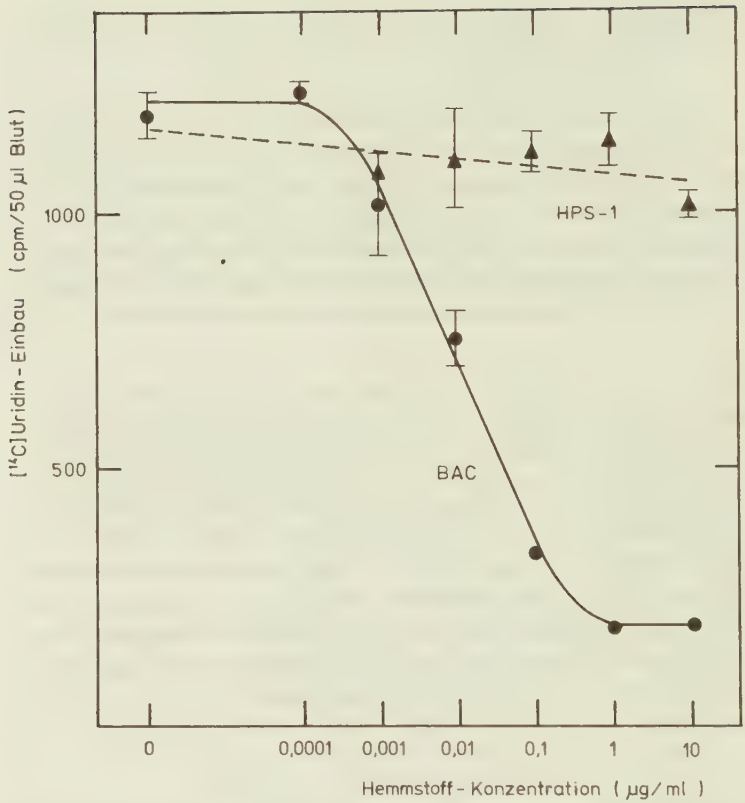


Fig.25: Vergleich der Wirkung von BAC und 114-HPS-1 auf die RNA-Synthese in unstimulierten Blutzellen.
Zu je 1 ml RPMI 1640 mit [^{14}C] Uridin (0,2 µCi, spez.Akt. 400 µCi/µMol) und verschiedenen Konzentrationen an BAC (●) bzw. 114-HPS-1 (▲) wurden je 50 µl Blut gegeben (Endkonzentrationen der Hemmstoffe siehe Abszisse). Nach 10 Stunden Inkubation Messung des [^{14}C] Uridin-einbaus. Inkubationsbedingungen vgl. Fig.21.

von BAC ist nämlich besonders stark konzentrationsabhängig. So wirken 0,01 µg BAC/ml bereits voll hemmend, während eine 10fach geringere Konzentration mehr als 75 % der ungehemmten DNA-Synthese gestattet (vgl. Fig.15). Durch eine geringe Volumenvermehrung kann man also unschädliche Hemmstoffkonzentrationen erreichen. Hinzu kommt (vgl. Ergebnisse der Vorversuche),daß eine einfache Volumenvergrößerung des Inkubationsansatzes von 0,1 ml auf 1 ml durch Mediumzusatz die Kulturbedingungen keineswegs beeinträchtigt (Ausnahme: DNA-Synthesephase),sondern im Gegenteil sogar verbessert. Dabei ist die Zunahme des Thymidineinbaus bei einer Verdünnung zwischen der 2. und 24. Stunde nach Mitogenzusatz immer gleich groß (vgl. Fig.15). Unter diesen günstigen Voraussetzungen läßt sich die Reversibilität der BAC-Wirkung auf die DNA-Synthese in mitogenstimulierten Blutzellen in den verschiedenen Stadien der Stimulierung bequem untersuchen.

Prinzipiell wurde dabei so vorgegangen,daß kleinvolumigen (0,1 ml bzw. 0,15 ml) Blutzellkulturen in verschiedenen Phasen der Stimulation BAC in der eben noch total hemmenden Konzentration von 0,01 µg/ml (vgl. Fig.15) zugesetzt wurde. Dann wurde diese Hemmstoffkonzentration nach verschieden langer Einwirkdauer durch Volumenerhöhung um den Faktor 10 auf 0,001 µg/ml verdünnt. In dieser Konzentration wird (vgl. Fig.15) die DNA-Synthese nur noch wenig gehemmt. Anschließend wurde die Kinetik der nachfolgenden DNA-Synthese verfolgt.

Mit dieser Methode wurde die Reversibilität der BAC-Wirkung in 4 verschiedenen Stimulationsphasen getestet:

1. noch vor Einwirkung des Mitogens (Fig.26),
2. nach 5-stündiger Mitogeneinwirkung (Fig.27),
3. nach 19-stündiger Mitogeneinwirkung (Fig.28),
4. nach 33-stündiger Mitogeneinwirkung,d.h. mitten in der nach 24 Stunden einsetzenden DNA-Synthesephase (Fig.29).

Zu 1: Der Hemmstoff wurde 5 Stunden vor dem Mitogen zugesetzt und zu verschiedenen Zeiten später - aber in jedem Fall vor der PHA-M-Zugabe - ausverdünnt. Wie die Ergebnisse dieses Versuchs zeigen, ist die Hemmwirkung von BAC voll reversibel. Selbst nach mehrstündiger Einwirkung des Hemmstoffs in der total hemmenden Konzentration von 0,01 µg/ml bewirkt ein einfaches Ausverdünnen um den Faktor 10, daß die DNA-Synthese daraufhin etwa das gleiche Ausmaß erreicht wie in jenen Proben (Fig.26a), die von Anfang an nur 0,001 µg BAC/ml enthielten, also in ihrer DNA-Synthesemöglichkeit von Beginn an kaum beeinträchtigt waren (vgl. Fig.26b,c,d mit a).

Interessant ist die Beobachtung, wie sich die Dauer der Einwirkung von 0,01 µg BAC/ml auf die Kinetik der DNA-Synthese nach Ausverdünnen der Hemmstoffkonzentration auf 0,001 µg/ml auswirkt.

Wie aus Fig.26 zu entnehmen ist, setzt die stimulierte DNA-Synthese in jedem Fall zur etwa gleichen Zeit ein, unabhängig davon, ob die Zellen vor Mitogenzusatz 0,5; 2 oder 5 Stunden 0,01 µg BAC/ml ausgesetzt waren. Dies ist insofern bemerkenswert, als durch diese Hemmstoffkonzentration auch die RNA-Synthese der noch nicht stimulierten Zellen zu etwa 50 % gehemmt wird (vgl. Fig.25).

Die Tatsache, daß sich die unterschiedlich lange Teilhemmung der RNA-Synthese noch vor der Stimulation nicht merklich auf den Zeitraum zwischen nachfolgendem Mitogenzusatz und dadurch bewirkter DNA-Synthese innerhalb von 24 Stunden auswirkt, spricht dafür, daß das Ausmaß der RNA-Synthese der noch unstimulierten Zellen offenbar ohne Einfluß auf den zeitlichen Ablauf der anschliessenden DNA-Synthese ist. Sonst wäre nämlich zu erwarten, daß je nach Dauer der BAC-Hemmung vor Zugabe des Mitogens eine entsprechende kompensatorische Verlängerung der bis zum Beginn der DNA-Synthese nötigen Einwirkdauer des Mitogens stattfände.

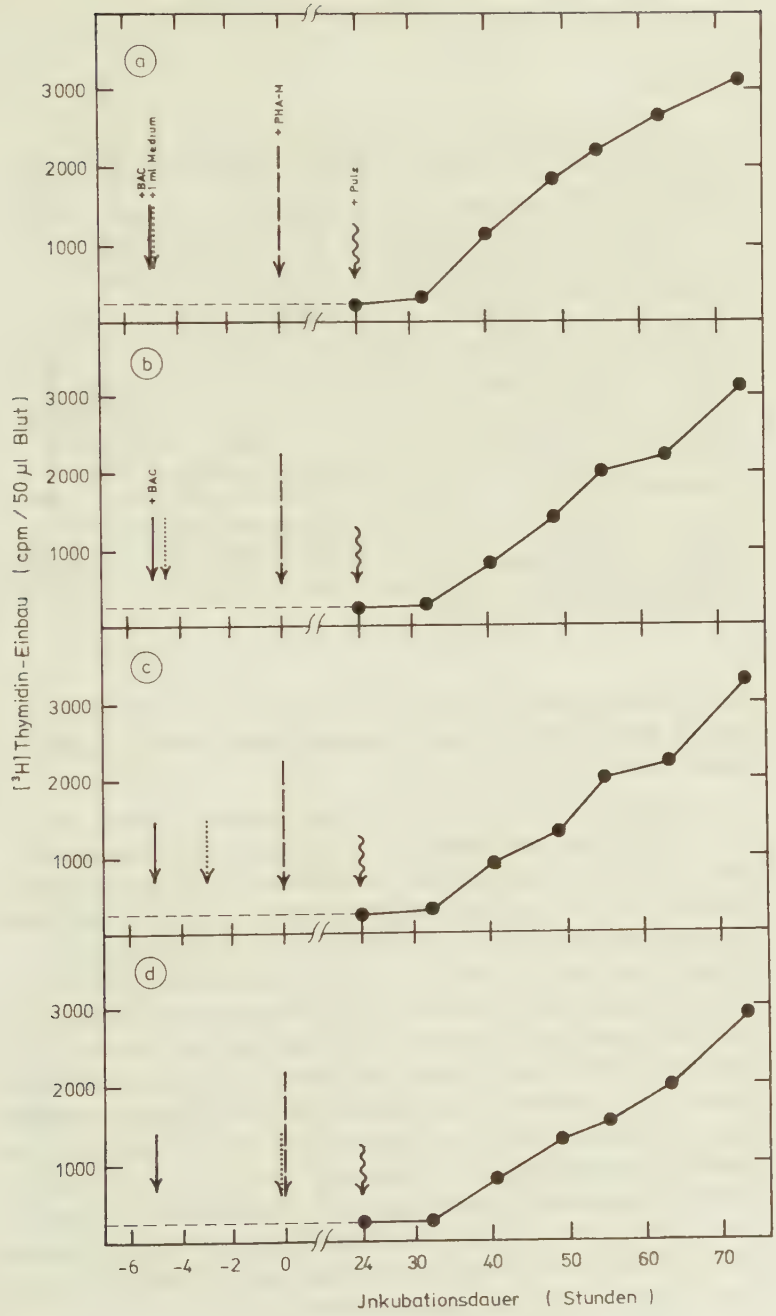


Fig.26 (Legende siehe folgende Seite)

Fig.26: Reversibilität der Wirkung von BAC,noch vor Mitogeneinwirkung zugesetzt,auf die mitogenstimulierte DNA-Synthese.
Zu je 50 µl Blut wurden zum Zeitpunkt -5 Stunden (d.n. 5 Stunden vor PHA-M-Zusatz) je 40 µl RPMI 1640 und 10 µl RPMI 1640 mit 0,1 µg BAC/ml zugesetzt (Endkonzentration BAC = 0,01 µg/ml). Zu den Zeitpunkten a) -5 Stunden (also zugleich mit der BAC-Zugabe), b) -4,5 Stunden, c) -3 Stunden und d) 0 Stunden (also zugleich mit dem PHA-M-Zusatz) wurden je 0,9 ml RPMI 1640 zugegeben und so die BAC-Konzentration auf 0,001 µg/ml erniedrigt. Zum Zeitpunkt 0 Zusatz von je 10 µl RPMI 1640 mit 25 mg PHA-M/ml (Endkonzentration PHA-M = 250 µg/ml). Zum Zeitpunkt 24 Stunden wurden je 50 µl RPMI 1640 mit [^{3}H]Thymidin (1 µCi,spez.Akt. 4,0 µCi/µMol) zugesetzt und anschließend der Thymidineinbau gemessen. Inkubationsbedingungen wie üblich: 37°,10% CO_2,7% O_2,83% N_2.

In einem entsprechenden Parallelversuch war sichergestellt worden,daß die eingesetzte Hemmkonzentration von 0,01 µg BAC/ml ohne Verdünnung um den Faktor 10 tatsächlich unter diesen Bedingungen die PHA-M-stimulierte DNA-Synthese total blockiert.

Zu 2: Anders sind die Verhältnisse,wenn BAC in einer frühen Stimulationsphase,5 Stunden nach Zusatz von Mitogen,einwirkt (Fig.27).

Hier zeigt sich deutlich,daß eine längere Wirkzeit des Hemmstoffs eine entsprechende Verzögerung im Beginn der nachfolgenden DNA-Synthese verursacht. Nach 5-stündiger Hemmung ist der Beginn der DNA-Synthese im Vergleich zur ungehemmten Probe um etwa 6 Stunden,nach 10-stündiger Wirkung des BAC um etwa 12 Stunden verzögert (Fig.27e). Dies beweist,daß in diesem Fall der Hemmstoff eine echte Unterbrechung der Vorbereitungsphase auf die DNA-Synthese bewirkt. Andererseits weist das Verhältnis von 5 Stunden Hemmung zu 6 Stunden Verzögerung bzw. 10 Stunden Hemmung zu 12 Stunden Verzögerung darauf hin,daß das System, abgesehen vom absoluten Zeitverlust durch die Dauer der Hemmwirkung,nach Ausverdünnen des Hemmstoffs offensichtlich sehr schnell wieder in den optimalen Zustand zurückfindet. Selbst eine 10-stündige Hemmstoffeinwirkung schädigt also das System nicht irreversibel.

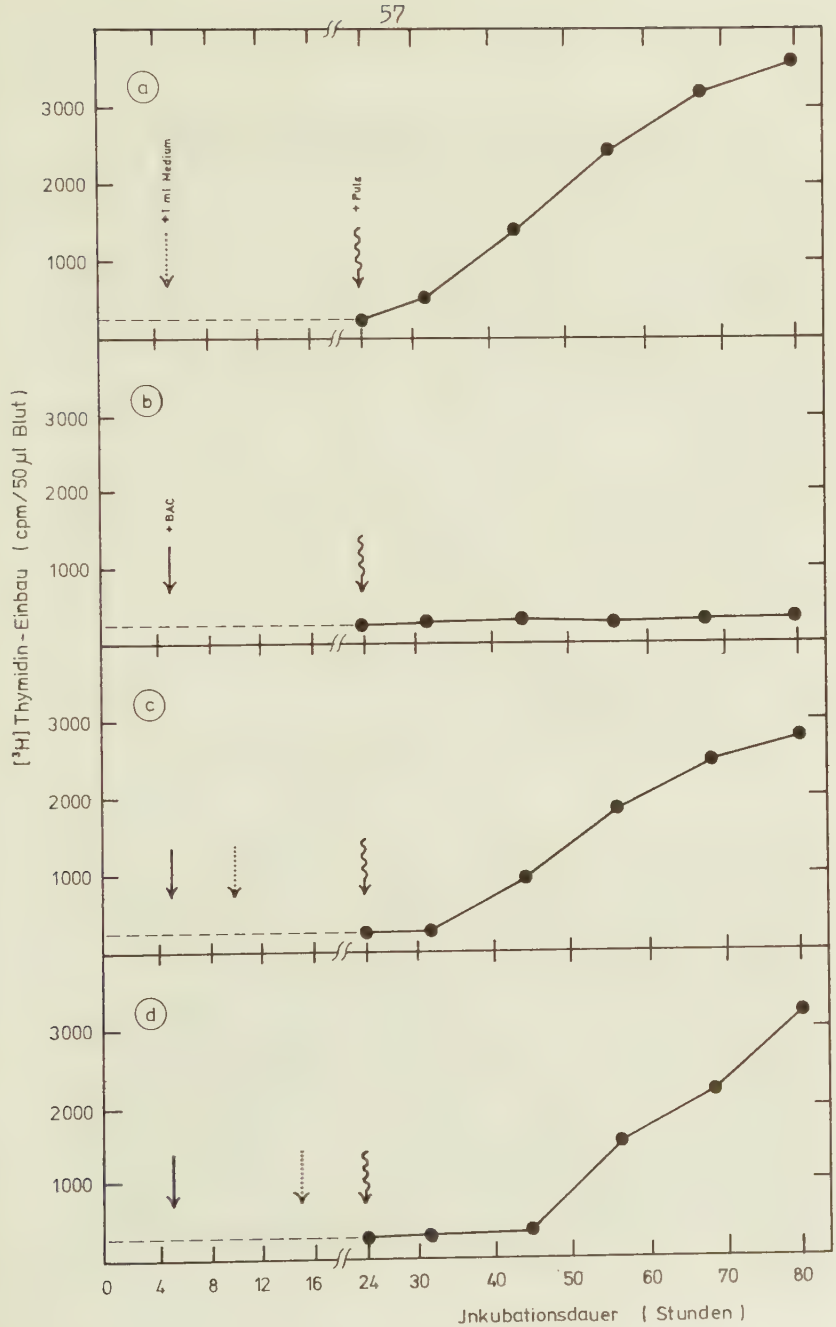


Fig.27 (Legende siehe folgende Seite)

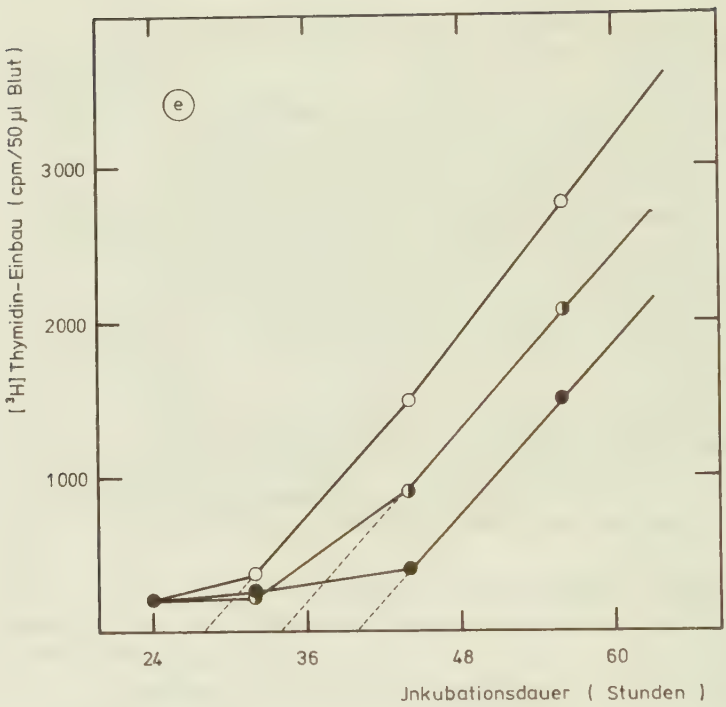


Fig.27: Reversibilität der Wirkung von BAC auf die mitogenstimulierte DNA-Synthese bei Einwirkung in der frühen Stimulationsphase (5 Stunden nach PHA-M-Zusatz). Zu je 50 µl Blut wurden je 40 µl RPMI 1640 mit 600 µg PHA-M/ml gegeben, inkubiert (Bedingungen s. Legende Fig.26) und nach 5 Stunden 0,91 ml RPMI 1640 (a) bzw. je 10 µl RPMI 1640 mit 0,1 µg BAC/ml (b,c und d) zugesetzt. Nach weiteren 5 Stunden (c) bzw. 10 Stunden (d) wurden zu den Testansätzen c und d je 0.9 ml RPMI 1640 gegeben und dadurch die vorhandene BAC-Konzentration von 0,01 µg/ml auf 0,001 µg/ml verdünnt. [^{3}H]Thymidin-Zugabe zum Zeitpunkt 24 Stunden (vgl. Legende Fig.26), danach jeweils Messung der Kinetik des Thymidineinbaus.

e: Anfangskinetik der Kurven a,c und d zusammengezeichnet zur besseren Demonstration der zeitlichen Verschiebungen um 6 Stunden (Kurven ○ und ◑) bzw. 12 Stunden (Kurven ○ und ●) - siehe Extrapolationen auf Abszisse - je nach vorheriger Einwirkdauer der wirksamen BAC-Konzentration (vgl. Text).

Zu 3: Ähnlich,wenn auch nicht ganz so deutlich ausgeprägt,ist die Situation bei Zugabe von BAC nach 19-stündiger Mitogeneinwirkung. Auch in diesem Fall kommt es,je nach Wirkdauer des Hemmstoffs,zu einer entsprechenden Verzögerung des Beginns der DNA-Synthese. Wie schon in der frühen Stimulationsphase (vgl. Fig.27) macht sich auch in der späten Phase die Wirkung des BAC nur als vorübergehende,reversible Unterbrechung der Vorbereitungen zur DNA-Synthese bemerkbar (Fig.28).

Zu 4: Wird BAC während der bereits ablaufenden DNA-Synthese dem Testansatz zugesetzt,so erweist sich auch hier die Hemmung als reversibel (Fig.29). Allerdings sind der von uns angewendeten Versuchstechnik innerhalb der DNA-Synthesephase Grenzen gesetzt. Denn die zur Verdünnung des Hemmstoffs nötige 10fache Erhöhung des Inkubationsvolumens bedingt jetzt eine echte Beeinträchtigung der DNA-Synthese (vgl. Fig.14). Dennoch ist zu sehen, daß das Ausverdünnen der hemmend wirkenden Konzentration von 0,01 µg BAC/ml (Fig.29a) 2,5 Stunden (Fig.29b) oder 5 Stunden nach Zugabe des Hemmstoffs (Fig.29c) zur laufenden DNA-Synthese im ersten Fall sofort,im zweiten Fall mit einer gewissen Verzögerung danach zu einer neuen DNA-Synthese führt. Deren Syntheserate entspricht weitgehend jener,die nach Erhöhung des Volumens des Inkubationsansatzes während der laufenden DNA-Synthese auch ohne Hemmstoff zu beobachten ist (vgl. Fig.29b und c, Kurven ● mit Fig.14,Kurve ▲).

Damit ist die Reversibilität der Hemmwirkung von BAC auch in dieser Phase des Zellzyklus demonstriert. Erst wenn BAC während der DNA-Synthese 12 Stunden einwirkt (Fig.29d), ist die Wirkung durch Verdünnen nicht mehr voll aufzuheben. Dann kommt es nur zu einer sehr geringen und erst nach langer Verzögerung einsetzenden DNA-Synthese nach Ausverdünnen des BAC. Nur in diesem Fall scheint der Testansatz durch den Hemmstoff nachhaltig beeinträchtigt zu sein.

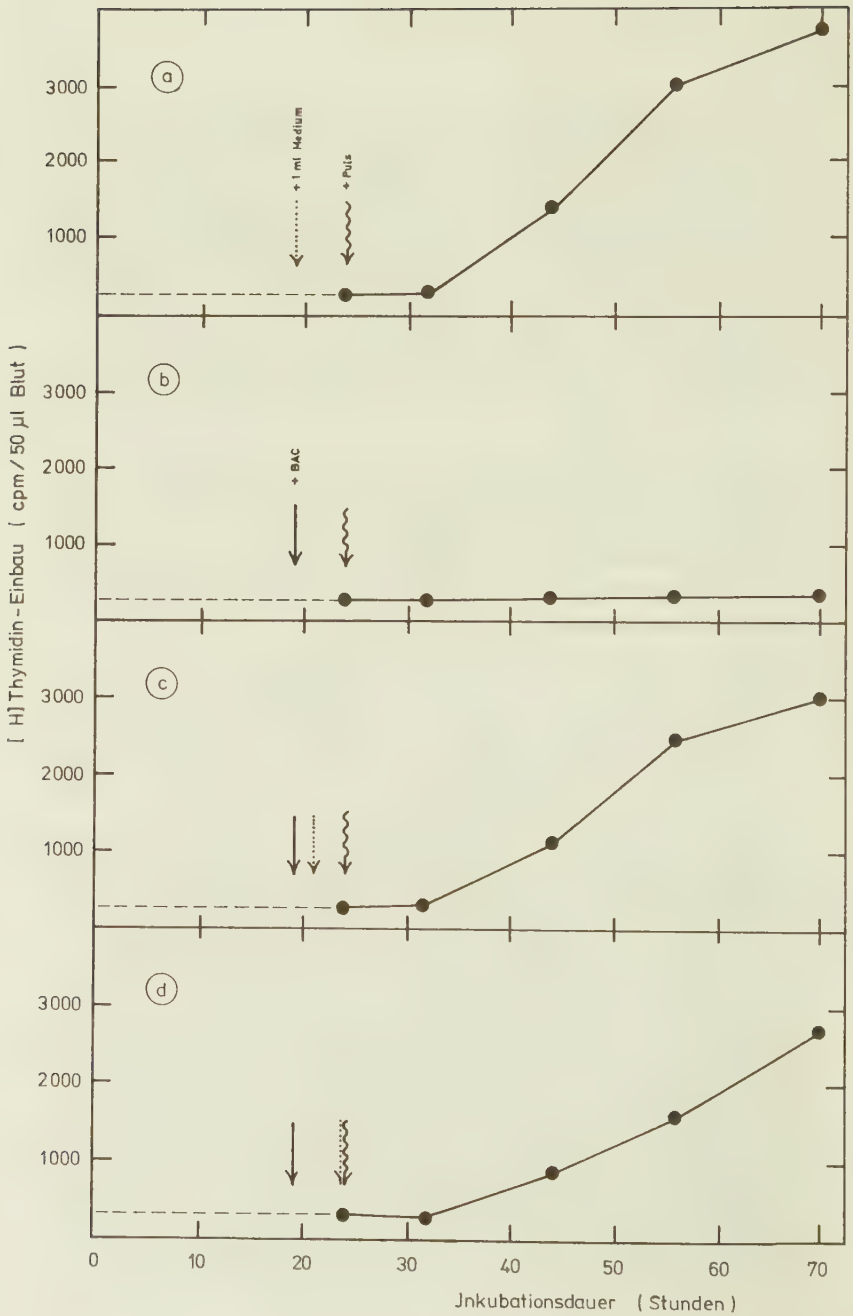


Fig.28 (Legende siehe übernächste Seite)

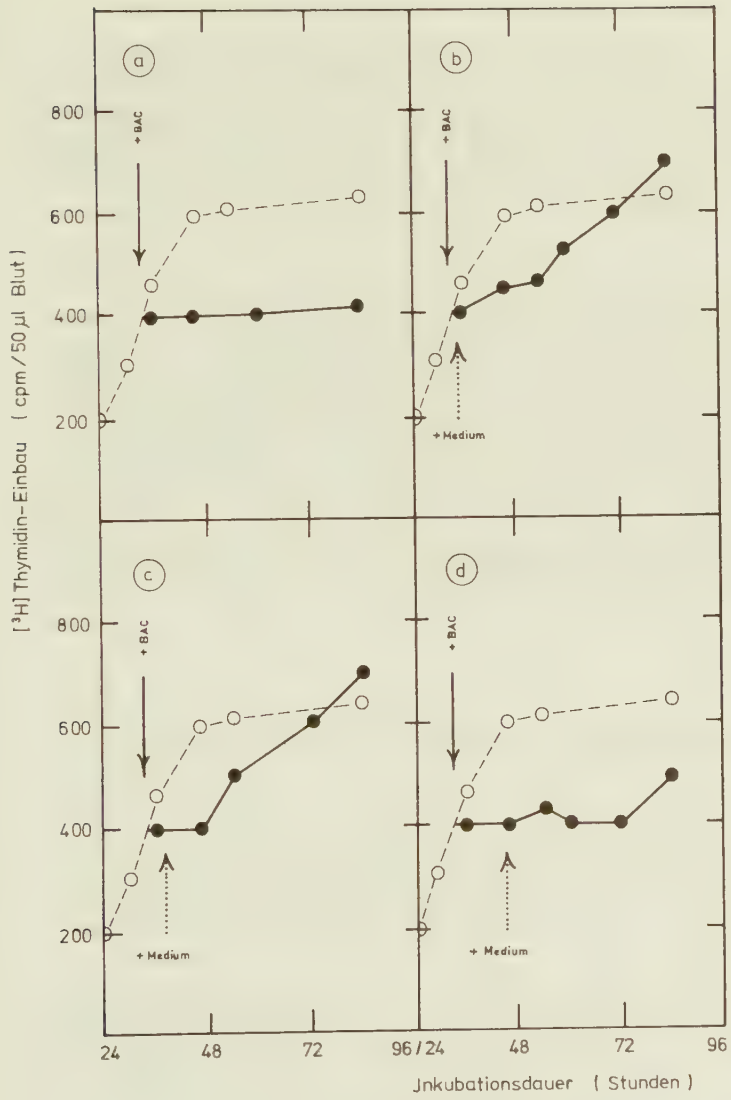


Fig.29 (Legende siehe folgende Seite)

Fig.28: Reversibilität der Wirkung von BAC auf die mitogenstimulierte DNA-Synthese bei Einwirkung in der späten Stimulationsphase (19 Stunden nach PHA-M-Zusatz). Ansatz ganz analog Fig.27 (s. Legende). RPMI 1640- bzw. BAC-Zusatz jedoch nicht schon nach 5,sondern erst nach 19 Stunden und Verdünnung nach weiteren 2 Stunden (c) bzw. 5 Stunden (d).

Fig.29: Reversibilität der Wirkung von BAC auf die mitogenstimulierte DNA-Synthese bei Einwirkung in der DNA-Synthesephase (33 Stunden nach PHA-M-Zusatz). Ansatz ebenfalls analog Fig.27 (s. Legende). RPMI 1640-Zusatz (s. Fig.14 Kurve ▲ = Teilversuch von Fig.29) bzw. BAC-Zugabe (je 10 µl RPMI 1640 mit 0,15 µg BAC/ml) zu den 0,15 ml Ansätzen (50 µl Blut + 50 µl RPMI 1640 + 50 µl [^{3}H] Thymidinlösung) jedoch erst nach[^{3}H] Thymidinzusatz (24. Stunde) zum Zeitpunkt 33 Stunden. Dann Verdünnung der wirksamen BAC-Konzentration (0,01 µg/ml) um den Faktor 10 durch Zugabe von je 1,35 ml RPMI 1640 nach weiteren 2,5 (b), 5 (c) und 12 Stunden (d) und Weiterinkubation mit Bestimmung der Kinetik des [^{3}H]Thymidineinbaus in Proben mit BAC (●) und Vergleichsproben ohne Hemmstoff (○).

VI. ZUR FRAGE DER ZELLSPEZIFITÄT DER BAC-WIRKUNG

Die bisher geschilderten Befunde zur Wirkung von BAC wurden alle an menschlichen Blutzellen gewonnen. Angesichts der gefundenen außerordentlich starken Hemmwirkung auf die Nucleinsäuresynthese in diesen Zellen - und zwar sowohl im mitogenstimulierten als auch im nichtstimulierten Zustand - lag es nahe,zu prüfen,ob auch Zellen nichtmenschlicher Herkunft dieselbe große Empfindlichkeit gegenüber diesem Hemmstoff zeigen.

Zu diesem Zweck wurde die Wirkung von BAC auch auf den Prokaryonten Escherichia coli,den primitiven Eu-

Karyonten Saccharomyces cerevisiae (Hefe) und Mauszellen (L 929) getestet*.

Im Falle des Prokaryonten Escherichia coli (Stamm K12) wurden die Zellen in Nährmedium ohne und mit BAC in Konzentrationen von 0,0001 µg/ml bis 10 µg/ml angezüchtet und innerhalb der logarithmischen Wachstumsphase die Zelldichte in den verschiedenen Proben durch Messung von ΔE_{430} bestimmt. In keinem Fall, auch nicht bei der höchsten eingesetzten Konzentration von 10 µg BAC/ml, konnte eine Beeinträchtigung des Wachstums im Vergleich zu Proben ohne BAC festgestellt werden. Dieser Befund wird durch Beobachtungen anderer Autoren gestützt, wonach 12,13-Epoxytrichothecene die Proteinsynthese höherer Zellen, nicht aber die der Prokaryonten hemmen können (Bamburg und Strong 1971).

Überraschend ist deshalb das Ergebnis entsprechender Versuche mit Saccharomyces cerevisiae**. Auch hier war selbst bei höchster Konzentration an BAC (10 ug/ml) keinerlei Hemmwirkung auf die Vermehrung der Hefezellen zu beobachten. Angesichts der Tatsache, daß nach Befunden von Stafford und McLaughlin (1973) und Schindler et al. (1974) die Hefeproteinsynthese durch BAC nahe verwandte 12,13-Epoxytrichothecene wie Verrucarin A, Trichodermin und Trichodermol sehr wohl gehemmt wird, spricht vieles dafür, daß in unserem Experiment die Hefezellwand der entscheidende Faktor für die Unempfindlichkeit gegenüber BAC ist.

* Für wertvolle Hilfe bei diesen Untersuchungen bin ich Frau Ilka Skrobek (Institut f. Biochemie der Universität München), Herrn Dipl. Biol. Michael Schweizer (Inst. f. Biochemie der Universität Würzburg), und Herrn Prof. Dr. Chr. Jungwirth (Inst. f. Virologie der Universität Würzburg) sehr zu Dank verpflichtet.

** Haploider Sacch. cerevisiae-Wildstamm x 2160-1B (α-Paarungstyp) von Dr. R. K. Mortimer.

Anders dagegen ist die Situation bei Mauszellen. Hier ist,ganz entsprechend den Befunden an menschlichen Blutzellen,eine starke Wirkung von BAC selbst in sehr geringer Konzentration (kleinste getestete Konzentration = 0,01 µg/ml) festzustellen. Wie sich zeigte,beeinträchtigt BAC schon bei dieser Konzentration - die ja auch in mitogenstimulierten Blutzellen die DNA-Synthese total blockiert (vgl. Fig.15) - das Wachstum der Zellen in Zellkultur sehr stark. Darüber hinaus scheint BAC in diesem Fall auch im engeren Sinn cytotoxisch insofern zu wirken,als die Zellen sich in Gegenwart von BAC nicht nur nicht oder kaum vermehren,sondern zudem nach mehrstündiger Einwirkung des Hemmstoffs typische Degenerationserscheinungen (Abrundung der Zellen,Ablösen von der Gefäßwand etc.) zeigen (Jungwirth,mündliche Mitteilung).

Weitergehende Untersuchungen im Zusammenhang mit diesem Fragenkomplex wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt. Deshalb können diese ersten Befunde zur Zellspezifität der BAC-Wirkung nur als vorläufige Orientierungsversuche gelten. Denn abgesehen von der nicht überraschenden Beobachtung,daß Mauszellen als hochdifferenzierte Säugerzellen sich gegenüber BAC offensichtlich ähnlich wie menschliche Blutzellen verhalten und BAC auf Colizellen keine Wirkung zeigt,muß die gefundene scheinbare Unempfindlichkeit der Hefezellen aus oben erwähnten Gründen mit Vorsicht interpretiert werden. Hier müssen weitere Experimente Klärung bringen.

VII. ÜBERLEGUNGEN ZUM WIRKUNGSMECHANISMUS VON BAC

Die geschilderten Untersuchungen zeigen deutlich,daß BAC ein außerordentlich wirksamer,reversibler Hemmstoff sowohl der DNA- als auch der RNA-Synthese in peripheren menschlichen Lymphozyten ist. Naturgemäß lassen sie jedoch keinen Schluß auf den primären Angriffspunkt innerhalb des Zellstoffwechsels zu. Allerdings hatten sich schon im Zusammenhang mit Untersuchungen zur Hemmkinetik Hinweise dafür ergeben,daß eine indirekte Blockierung der Nucleinsäuresynthese durch BAC - beispielsweise infolge Verarmung des Nucleotidpools - plausibler erscheint als ein direktes Einwirken auf den DNA-und RNA-Synthesemechanismus (vgl. S.50)

Naheliegend ist die Hypothese,daß nicht die Makromolekülsynthese selbst,sondern möglicherweise der Energiestoffwechsel das eigentlich primäre Ziel der so ausgeprägten BAC-Wirkung auf die Zelle ist. Würde BAC durch Blockade der Atmungskette die Energieproduktion der Zelle lahmlegen,so wäre notwendigerweise sekundär auch jegliche Makromolekülsynthese blockiert. Um diese These zu prüfen,hat Prof. M. Klingenberg, München,freundlicherweise die Wirkung von BAC auf die oxydative Phosphorylierung in Rattenlebermitochondrien untersucht. Es konnte jedoch keine Hemmwirkung gefunden werden (Klingenberg,mündliche Mitteilung,1973). Dies spricht eindeutig gegen die Vermutung einer Beteiligung des Energiestoffwechsels bei der BAC-Wirkung.

Eine zweite,auch bei anderen Autoren vorherrschende Auffassung sieht nicht im Energiestoffwechsel und nicht in der Nucleinsäuresynthese,sondern vielmehr

in der Proteinsynthese das primäre Ziel der 12,13-Epoxytrichothecene (Ohtsubo et al.1972; Carrasco et al.1973; Tate und Caskey 1973; Ueno et al.1973; Stafford und McLaughlin 1973; Cundliffe et al.1974; Wei et al.1974 a,b; Schindler et al.1974; Barbacid und Vasquez 1974). Unter diesem Gesichtspunkt wäre die im Verlaufe dieser Untersuchungen gefundene starke Hemmwirkung von BAC auch auf die Nucleinsäuresynthese ein deutlicher Beweis für eine außerordentlich enge Koppelung von Protein- und Nucleinsäuresynthese in mitogenstimulierten peripheren menschlichen Lymphozyten. Denn bereits spätestens 2 Stunden nach Zusatz von BAC in ausreichender Konzentration kommt es zur totalen Blockierung sowohl der DNA- als auch der RNA-Synthese (vgl. Fig.19, 22, 24 und 29a).

Unter der hypothetischen Annahme,daß BAC die Proteinsynthese augenblicklich,unmittelbar und total blockiert, läßt sich dann schlußfolgern,daß infolge fehlender Neusynthese innerhalb von maximal nur 2 Stunden ein oder mehrere für die Nucleinsäuresynthese essentielle(r) Proteinfaktor(en) unter einen kritischen Schwellenwert abgesunken sein müssen,unterhalb dessen weder eine DNA- noch eine RNA-Synthese aufrechterhalten werden kann*. Diese Proteinfaktoren könnten möglicherweise die für die Nucleotidsynthese notwendigen Enzyme, oder etwa die Polymeraseenzyme selbst,beispielsweise aber auch bestimmte,metabolisch labile,die Nucleinsäuresynthese regulierende Proteine sein. Der Befund, daß die DNA-Synthese schon durch BAC-Konzentrationen total blockiert wird,bei denen eine durchaus noch nennenswerte RNA-Synthese ablaufen kann (vgl. Fig.15 und 21),daß also die DNA-Synthese durch den Hemmstoff direkter betroffen wird als die RNA-Synthese,müßte dann als Indiz für eine entsprechend engere Koppelung des DNA-Synthesemechanismus an die Proteinsynthese

* Nach Befunden an Mäuselymphozyten bestehen weitgehende Parallelen in der Kinetik der Hemmung von Protein- und Nucleinsäuresynthese durch BAC (Richter,mündl. Mittlg.). Dies spricht dafür,daß DNA- bzw. Nucleinsäuresynthese allgemein nur bei gleichzeitiger Proteinsynthese möglich ist.

gelten. Auf welchen molekularen Mechanismen allerdings eine solche engere Koppelung basieren könnte, wäre, ebenso wie die Vermutung einer für die Nucleinsäuresynthese folgenschweren Verarmung des Enzymvorrates der Zelle innerhalb von nur 2 Stunden, durch entsprechende Experimente erst noch zu untersuchen.

Zu prüfen ist auch, ob 12,13-Epoxytrichothecene tatsächlich nur die Proteinsynthese oder nicht vielleicht auch andere Stoffwechselfunktionen der Zelle direkt beeinflussen können.

Schon bei der Hemmung der Proteinsynthese zeigt sich, daß der Wirkungsmechanismus bei den einzelnen Vertretern dieser Stoffklasse trotz naher struktureller Verwandtschaft bemerkenswert unterschiedlich ist. Während einige 12,13-Epoxytrichothecene vorwiegend den Terminations- und (oder) Elongationsschritt der Proteinsynthese zu hemmen scheinen, werden andere für Hemmstoffe des Initiationsschrittes gehalten. Darüber hinaus hat sich gezeigt, daß sogar Unterschiede im Hemmechanismus unter <u>in vitro</u> und <u>in vivo</u> Bedingungen existieren. So erwiesen sich beispielsweise Verrucarin A, Scirpentriol und Diacetoxyscirpenol, die nach <u>in vivo</u> Untersuchungen als Inhibitoren der Initiation gelten, bei <u>in vitro</u> Tests als Hemmer der Peptidyltransferase (Wei et al. 1974b). Schon diese Beobachtungen sprechen für eine ungewöhnliche Breite der Inhibitorwirkung von 12,13-Epoxytrichothecenen auf Eukaryontenzellen.

Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang auch der Befund von Richter (1974), daß in Mäuselymphozyten bei Konzentrationen an BAC, die die DNA-Syntnese völlig blockieren, die Proteinsynthese noch zu etwa 50 Prozent abläuft. Diese Beobachtung spricht zwar nicht notwendigerweise gegen die Annahme einer durch pri-

märe Blockierung der Proteinsynthese verursachte sekundäre Hemmung der Nucleinsäuresynthese - beispielsweise könnte die Synthese hypothetischer,die Nucleinsäuresynthese regulierender Proteine schon völlig ausfallen,wenn die Gesamtproteinsynthese erst teilweise blockiert ist. Dennoch erscheint angesichts dieser signifikanten Empfindlichkeitsdifferenz die These von der primären Wirkung von BAC allein auf die Proteinsynthese einer kritischen Prüfung wert.

Unter diesem Aspekt sind auch Befunde anderer Autoren interessant,die eine überraschend große Diskrepanz in der Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung von 12,13-Epoxytrichothecenen in vivo und in vitro beobachteten. So fanden zum Beispiel Ueno et al. (1973),daß in vivo Diacetoxyscirpenol (das sich von BAC nur durch dessen salzartigen Charakter unterscheidet) in Kaninchenreticulozyten bei einer Konzentration von 0,03 µg/ml zu einer 50 prozentigen Hemmung der Proteinsynthese führt. Eine gleich starke Hemmung der Proteinsynthese in vitro,gemessen als poly-U-gesteuerte Polyphenylalaninsynthese an Ribosomen aus Kaninchenreticulozyten, konnte dagegen erst bei 5 µg Diacetoxyscirpenol/ml gefunden werden. Ähnlich große Unterschiede zwischen der in vivo und in vitro Wirkung von 12,13-Epoxytrichothecenen fanden auch Wei und McLaughlin (1974).

Nun ist allerdings schon von Untersuchungen mit anderen,potenten Proteinsyntheseinhibitoren bekannt,daß die Empfindlichkeit von in vitro Modellsystemen,speziell der poly-U-gesteuerten Polyphenylalaninsynthese, oft deutlich unter der Empfindlichkeit der Proteinsynthese in vivo liegt (Vasquez 1966). Dieser Befund böte also schon eine plausible Erklärungsmöglichkeit für die erwähnten auffälligen Differenzen der 12,13-Epoxytrichothecenwirkung in vivo und in vitro.

Eine zweite, freilich rein hypothetische Interpretation jener Befunde ergäbe sich aus der Annahme, daß die Einwirkungsmöglichkeiten für 12,13-Epoxytrichothecene im Zellstoffwechsel vielleicht doch nicht nur auf die Proteinsynthese beschränkt sind - eine These, die auch von Bamburg (1972) angezweifelt wird - sondern möglicherweise auch andere Zellstrukturen, etwa die Zellwand, weitere, empfindliche Ziele der Toxinwirkung sind. Die relative Lipophilie der 12,13-Epoxytrichothecene läßt eine solche Wechselwirkung mit der Zellmembran im Sinne einer Blockierung des für die Makromolekülsynthese essentiellen Stoffdurchtritts möglich erscheinen.

Auch mit Hilfe dieser Hypothese ließe sich erklären, warum in vitro vergleichsweise hohe Hemmstoffkonzentrationen zur direkten Blockierung der Proteinsynthese durch Wechselwirkung zwischen Toxin und den proteinsynthetisierenden Zellstrukturen nötig sind, während in vivo, bei intakten Zellen, schon weit geringere Dosen zur Blockierung zellwandgebundener Transportvorgänge führen könnten, deren Ausfall dann sekundär ebenfalls einen Abbruch der Makromolekülsynthese, also sowohl der Protein- als auch der Nucleinsäuresynthese, zur Folge haben könnte. Inwieweit diese Theorie zur Klärung der offenbar recht komplexen Wirkungsweise von 12,13-Epoxytrichothecenen beitragen kann, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

Unabhängig von der Frage, welche Zellstruktur oder -strukturen nun primär mit BAC in Wechselwirkung treten, zeigt aber die Tatsache, daß die Hemmung der DNA-Synthese durch BAC leicht - nämlich durch einfaches Ausverdünnen der hemmenden BAC-Konzentration um den Faktor 10 - rückgängig gemacht werden kann, daß in fast jedem Fall die den Abbruch der Nucleinsäuresynthese

letztlich verursachende BAC-Reaktion,mit welchem Zellbestandteil auch immer,bis auf ganz wenige Situationen leicht reversibel sein muß.

Nur in einem Fall,nämlich nach 12 stündiger BAC-Einwirkung auf die bereits ablaufende DNA-Synthese, scheint eine volle Reversibilität der Hemmwirkung zumindest fraglich zu sein (vgl. Fig.29 d). Im Falle einer BAC-Zugabe bei bereits ablaufender DNA-Synthese setzt nach Ausverdünnen des Hemmstoffs die Resynthese von DNA umso eher wieder ein,je kürzer die vorausgegangene Einwirkzeit des BAC in hemmender Konzentration war (vgl. Fig.29 b,c und d). Auch dies spricht dafür,daß es sich bei der Hemmwirkung von BAC auf die DNA-Synthese um eine indirekte,über mehrere Faktoren verknüpfte Wechselwirkung handelt.

Ein vorübergehender Ausfall der durch BAC gehemmten Stoffwechselreaktion(en) und deren Folgereaktionen - unter anderem auch die Nucleinsäuresynthese - hat aber offenbar in weitem Rahmen keine längerfristige, irreparable,oder gar lethale Schädigung der Zelle zur Folge. Dies läßt die Verwendung von BAC für weitere Untersuchungen auch in medizinischer Hinsicht lohnenswert erscheinen.

Z U S A M M E N F A S S U N G

Betainyldiacetoxyscirpenoliumchlorid (Betainylanguidinchlorid,BAC) kann jegliche Nucleinsäuresynthese sowohl in mitogenstimulierten als auch in unstimulierten peripheren menschlichen Lymphozyten total blockieren. Die hierzu nötigen Hemmstoffkonzentrationen sind außerordentlich gering. Zur 50 prozentigen Hemmung der DNA-Synthese in PHA-M-stimulierten Lymphozyten genügen 0,003 µg BAC/ml,entsprechend 5 x 10^{-9}M. Eine 100 prozentige Hemmung ist ab einer Konzentration von 0,01 µg BAC/ml,entsprechend 1,33 x 10^{-8}M zu beobachten. Die RNA-Synthese in mitogenstimulierten Lymphozyten wird durch 0,005 µg BAC/ml (ca. 8 x 10^{-9}M) zu 50 Prozent, und durch 10 µg BAC/ml (1,33 x 10^{-5}M) zu 100 Prozent blockiert. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen der Empfindlichkeit der RNA-Synthese gegenüber BAC in stimulierten und unstimulierten Zellen. Die Hemmwirkung von BAC auf die DNA- und RNA-Synthese in mitogenstimulierten Lymphozyten ist unabhängig von der Stimulierungsphase und setzt in jedem Fall innerhalb von maximal 2 Stunden nach Hemmstoffzusatz ein. Die Hemmung ist reversibel. Diese Reversibilität ist, wie auch die Hemmwirkung selbst,unabhängig vom Zustand des Zellstoffwechsels während verschiedener Phasen der Mitogenstimulierung.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

Bamburg, J.R. and Strong, F.M. (1971) "12,13-Epoxytrichothecenes", erschienen in: Microbial Toxins, eds. Kadis, S., Ciegler, A. and Ajl, S.J., 7, 207-292.

Bamburg, J.R. (1972) "The biological activities and detection of naturally occuring 12,13-epoxy-Δ^9-trichothecenes", Clin. Toxicol. 5, 495-515.

Barbacid, M. and Vasquez, D. (1974) "Binding of acetyl-^{14}C Trichodermin to the Peptidyl Transferase Centre of Eukaryotic Ribosomes", Europ. J. Biochem. 44, 437-444.

Carrasco, L., Barbacid, M. and Vasquez, D. (1973) "The trichodermin group of antibiotics,inhibitors of peptide bond formation by eucaryotic ribosomes", Biochim. Biophys. Acta 312, 368-376.

Cundliffe, E.,Cannon, M. and Davies, J. (1974) "Mechanism of inhibition of eucaryotic protein synthesis by trichothecene fungal toxins", Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 71, 30-34.

Dawkins, A.W., Grove, J.F. and Tidd, B.K. (1965) "Diacetoxyscirpenol and some related compounds", Chem. Commun. 20, 27-28.

Edelman, G.M., Cunningham, B.A., Reeke, G.N., Becker, J.W., Waxdal, M.J. and Wang, J.L. (1972) "Covalent and 3-dimensional structure of Concanavalin A", Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 69, 2580-2587.

Grove, J.F. and Mortimer, P.H. (1969) "The cytotoxicity of some transformation products of diacetoxyscirpenol", Biochem. Pharmacol. 18, 1473-1478.

Kay, J.E. (1966) "RNA and protein synthesis in lymphocytes incubated with Phytohaemagglutinin", in: The biological effects of Phytohaemagglutinin. The Robert Jones and Agnes Hunt orthopaedic hospital management committee, Oswestry, England, 37-52.

Ling, N.R. (1968) "Lymphocyte stimulation",North Holland Pub. Co., Amsterdam.

Newsome, J. (1963) "In vitro production of antibody lymphocytes", Lancet ii, 91-92.

Ohtsubo, K., Kaden, P. and Mittermayer, C. (1972) "Polyribosomal breakdown in mouse fibroblasts (L-cells) by fusarenon-X,a toxic principle isolated from fusarium nivale", Biochim. Biophys. Acta 287, 520-525.

Park, B.H. and Good, R.A. (1972) "A new micromethod for evaluating lymphocyte responses to PHA. Quantitative analysis of the function of thymus-dependent cells", Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 69, 371-373.

Pogo, B.G.T., Allfrey, V.G. and Mirsky, A.E. (1966) "RNA synthesis and histone acetylation during the course of gene activation in lymphocytes", Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 55, 805-812.

Reichert, C.F., Pan, P.M., Mathews, K.P. and Goldstein, I.J. (1973) "Lectin-induced blast transformation of human lymphocytes", Nature New Biol. 242, 146-147.

Richter, H. (1974) "Wirkung einiger 12,13-Epoxytrichothecene auf unstimulierte und mit Concanavalin A stimulierte Mäusemilz-Lymphocyten", Diplomarbeit, Naturwissenschaftliche Fakultät, Universität Würzburg.

Rüsch, M.E. und Stähelin, H. (1965) "Über einige biologische Wirkungen des Cytostaticum Verrucarin A", Arzneimittel-Forsch. 15, 893-897.

Schindler, D., Grant, P. and Davies, J. (1974) "Trichodermin resistance-mutation affecting eukaryotic ribosomes", Nature 248, 535-536.

Sigg, H.P., Mauli, R., Flury, E. und Hauser, D. (1965) "Die Konstitution von Diacetoxyscirpenol", Helv. Chim. Acta 48, 962-988.

Stafford, M.E. and McLaughlin, C.S. (1973) "Trichodermin,a possible inhibitor of the termination process of protein synthesis", J. Cell. Physiol. 82, 121-128.

Stähelin, H., Kalberer-Rüsch, M.E., Signer, E. und Lazary, S. (1968) "Über einige biologische Wirkungen des Cytostaticums Diacetoxyscirpenol", Arzneimittel-Forsch. 18, 989-994.

Sumner, J.B. and Howell, S.F. (1936) "Identification of the hemagglutinin of the Jack bean with Con A", J. Bacteriol. 32, 227-231.

Tate, W.P. and Caskey, C.T. (1973) "Peptidyltransferase inhibition by trichodermin", J. Biol. Chem. 248, 7970-7972.

Ueno, Y., Nakajima, M., Sakai, K., Ishii, K., Sato, N. and Shimada, N. (1973) "Comparative toxicolgy of trichothec myotoxins: Inhibition of protein synthesis in animal cells", J. Biochem.(Tokyo) 74, 285–296.

Vasquez, D. (1966) "Antibiotics affecting Chloramphenicol uptake by bacteria", Biochim. Biophys. Acta 114, 289–295.

Wei, C.-M., Hansen, B.S., Vaughan, M.H. and McLaughlin, C.S. (1974a) "Mechanism of action of the mycotoxin trichodermin,a 12,13-epoxytrichothecene", Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 71, 713–717.

Wei, C.-M., Campbell, J.M., McLaughlin, C.S. and Vaughan, M.H. (1974b) "Binding of trichodermin to mammalian ribosomes and its inhibition by other 12,13-epoxytrichothecenes", Mol. Cell. Biochem. 3, 215–223.

Wei, C.-M. and McLaughlin, C.S. (1974) "Structure-function relationship in the 12,13-epoxytrichothecenes – novel inhibitors of protein synthesis", Biochem. Biophys. Res. Commun. 57, 838–844.

Wilson, D.B. (1966) "Analysis of some of the variables associated with the proliferative response of human lymphoid cells in culture", J. Exptl. Zool. 162, 161–169.

Weiner, E.M. (1973) "Über die Wirkung des Sesquiterpens Ovalicin auf Mitogen-stimulierte Lymphocyten", Diplomarbeit, Naturwissenschaftliche Fakultät, Universität Würzburg.

A B K Ü R Z U N G S V E R Z E I C H N I S

BAC	Betainylanguidinchlorid = Betainyl diacetoxyscirpenoliumchlorid
Con A	Concanavalin A
DNA	Desoxyribonucleinsäure
PHA-M	Phytohämagglutinin-M (Medium)
Phe	Phenylalanin
RNA	Ribonucleinsäure
U	Uridin

Vorliegende Arbeit entstand im Einvernehmen mit Prof. Dr. E. Wecker, Vorstand des Instituts für Virologie der Universität Würzburg, und mit dessen Unterstützung in der Zeit von Oktober 1972 bis März 1974 am Institut für Biochemie der Universität (Vorstand: Prof. Dr. G. Hartmann).
Hinsichtlich neuerer Literatur sei verwiesen auf: Hartmann G. R., Richter H., Weiner E. M. and Zimmermann W. (1978) "On the Mechanism of Action of the Cytostatic Drug Anguidine and of the Immunosuppressive Agent Ovalicin, two Sesquiterpenes from Fungi", Planta Medica 34, 231 - 252.

L E B E N S L A U F

Name: Tillmann Johannes Neudecker

geboren: 20. 6. 1944 in Würzburg

Eltern: Dr. Constantin Neudecker, Reg.-Chemierat,
seit 1945 im Krieg vermißt.
Frieda Neudecker, geb. Klett, gestorben 1967.

Ausbildung: 1950-1956 Volksschule in Würzburg
1956-1957 Deutsches Gymnasium Würzburg
1957-1959 Deutsches Gymnasium Eichstätt
1959-1964 Deutsches Gymnasium Würzburg
1964 Abitur
WS 1964 - SS 1972 Studium der Biologie, Universität Würzburg
1967 Diplom-Vorprüfung
1970 Diplom-Hauptprüfung
1973 Promotion zum Dr. rer. nat.
WS 1972 - SS 1979 Studium der Medizin, Universität Würzburg, unterbrochen vom Mai 1974 - September 1975 durch einen Studienaufenthalt an der University of Southern California in Los Angeles, USA, als Stipendiat der Harkness Foundation in New York.
1973 Naturwissenschaftliche Vorprüfung
1974 Ärztliche Vorprüfung
1976 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
1978 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Oktober 1978 - September 1979 "Praktisches Jahr" an den Universitätskliniken für Chirurgie, Innere Medizin und Psychiatrie in Würzburg.
1979 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Beschäftigungsverhältnisse: April 1970 - März 1974
Wissenschaftliche Hilfskraft
bzw. Wissenschaftlicher Assistent
am Institut für Biochemie der
Universität Würzburg (Vorstand:
Prof. Dr. G. Hartmann).

Seit Dezember 1975 bis jetzt
Wissenschaftlicher Assistent am
Institut für Toxikologie der
Universität Würzburg (Vorstand:
Prof. Dr. D. Henschler).

Verheiratet seit 1966, 1 Kind.

D. T. Nüchter

Citydruck · Haugerglacisstraße · 8700 Würzburg